Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor: Professor Dr. W. Schneider
des Zentralinstituts für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen

NACHWEIS VON IgG-ANTIKÖRPERN im ABO-SYSTEM mittels DEAE-SEPHADEX A-50 IN EINEM SCHWANGERENKOLLEKTIV

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)

der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Alfons Schach
aus Horb

1979

Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor: Professor Dr. W. Schneider
des Zentralinstituts für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen

NACHWEIS VON IgG–ANTIKÖRPERN im ABO–SYSTEM mittels DEAE–SEPHADEX A–50 IN EINEM SCHWANGERENKOLLEKTIV

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)

der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Alfons Schach
aus Horb

1979

Dekan:	Professor Dr. Dr. N. Schwenzer
Berichterstatter:	Professor Dr. W. Schneider

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A: Einleitung	
1. Geschichtlicher Überblick.	1-2
2. Klinisches Bild des Morbus haemolyticus neonatorum im ABO-System.	3-4
3. Pathogenese der ABO-Erythroblastose.	5-15
4. Allgemeines zur Diagnose der ABO-Erythroblastose.	16-28
5. Therapie.	28-30
B: Aufgabenstellung dieser Arbeit	
1. Untersuchungsgut.	31-32
2. Methodik.	32-43
a) Suche nach Hämolysinen.	32-37
b) DEAE-Sephadex A-50 Gelpräparation und Batch-Verfahren.	37-43
C: Ergebnisse	
Suche nach Hämolysinen	
1. Bei der Blutgruppe A.	44
2. Bei der Blutgruppe B.	45
3. Bei der Blutgruppe O.	45-49
Nachweis von IgG-Anti-A/B-Antikörpern mit dem DEAE-Sephadex A-50 Batch-Verfahren	
1. Bei der Blutgruppe A.	50
2. Bei der Blutgruppe B.	50-51
3. Bei der Blutgruppe O.	51-53
4. Einfluß des Alters.	53-57
5. Vergleich von Erst- und Mehrgebährenden.	57-60
6. Einfluß der Schwangerschaftsdauer.	60-63

Seite

7. Zusammenhang zwischen IgG-Anti-A- und IgG-Anti-B-Titer. 63-64
8. Zusammenhang zwischen IgG-Anti-A/B-Titer und dem Auftreten von Anti-A/B-Hämolysinen. 64-66
9. Zusammenhang zwischen dem kombinierten Auftreten von Anti-A- und -B-Hämolysinen und dem IgG-Anti-A/B-Titer. 66
10. Vergleich der Antikörperkonzentrationen bei Schwangeren und nicht schwangeren Spenderinnen. 66-69
11. Verwendung von monospezifischen Seren. 69-70
12. Vergleich der 27 Seren von Müttern, deren Kinder Symptome der ABO-Erythroblastose zeigten, mit dem Kollektiv der Schwangeren. 70-73

D: Diskussion 74-87

E: Zusammenfassung 88-89

F: Statistik 90-95

G: Literaturverzeichnis 96-104

A: Einleitung

1. Geschichtlicher Überblick:

Nach der Entdeckung der ABO-Blutgruppen durch Karl LANDSTEINER (44) um die Jahrhundertwende ergab es sich fast von selbst, daß man eine Blutgruppeninkompatibilität zwischen Mutter und Fetus als Krankheitsursache für den Morbus haemolyticus neonatorum ins Auge faßte.

1905 stellte DIENST (17) bei Untersuchungen über Eklampsie fest, daß es in manchen Fällen eine direkte Verbindung zwischen mütterlichem und kindlichem Kreislauf, während der Geburt gibt und postulierte eine zufällige intrauterine Transfusion von inkompatiblem fetalem Blut in den mütterlichen Kreislauf. Andere Untersucher wie OTTENBERG 1923 schlugen vor, daß die ABO-Unverträglichkeit der Grund für den Neugeborenenikterus wäre.

Diese Hypothese wurde jedoch verlassen, als man erkannte, daß ABO-kompatible Kinder an einem schweren Morbus haemolytikus neonatorum erkranken können.

1939 fanden LEVINE und Mitarbeiter, daß die Erythroblastosis fetalis über die Sensibilisierung der Mutter durch ein Blutgruppenantigen des Kindes, das der Mutter fehlt, zustande kommt. Ein Jahr später entdeckten LANDSTEINER und WIENER (45) dieses Antigen, den Rhesus-Faktor.

Erst mit der Entdeckung des Rhesus-Faktors (45) und der Erforschung dessen Rolle bei der Pathogenese der Erythroblastosis fetalis (46) wurde neues Interesse an der Erforschung dieser Krankheit geweckt.

Jedoch nur ein Teil der Fälle konnte mit der Rhesus-Sensibilisierung der Mutter erklärt werden, weil man viele Fälle beobachtete, wo die Mutter Rhesus positiv war.

Diese Beobachtung gab den Anstoß für eine erneute Erforschung von Sensibilisierungen im ABO-System. Von HALBRECHT (31) wurde 1944 ein Syndrom beschrieben, das er als Ikterus praecox bezeichnete. Die Kinder mit dieser klinischen Einheit entwickelten frühzeitig einen Neugeborenenikterus und fakultativ eine milde Anämie. HALBRECHT stellte bei 57 von 60 solchen Fällen eine heterospezifische Schwangerschaft fest,

d.h. die Erythrozyten der Neugeborenen hatten ein Agglutinogen A oder B, zu dem sich die Serumeigenschaften der Mutter inkompatibel verhielten. Die von HALBRECHT studierten Fälle waren, wie man heute weiß, milde Verlaufsformen der ABO-Erythroblastose.
1945 berichtete POLAYES (58) von 6 Fällen, die einer ABO-Sensibilisierung zugeschrieben wurden und klinisch so schwer verliefen, wie bei der Rhesus-Sensibilisierung.

Wenige Jahre nach der Entdeckung des Rhesus-Faktors konnten verschiedene Typen von Blutgruppenantikörpern unterschieden werden (60).
BOORMAN und DODD (1945) sowie WITEBSKY (1948) zeigten, daß die menschlichen Immun-Anti-A- und -B-Antikörper sich ähnlich wie die Rhesus-Antikörper verhalten. Durch parallele Untersuchungen in Proteinmedien und physiologischer Kochsalzlösung konnten bis dahin inkomplette Anti-A- oder -B-Antikörper neben den Isoagglutininen dargestellt werden.
Der Antiglobulintest von COOMBS, MOURANT und RACE (1945) ermöglichte eine weitere Unterteilung und Erforschung der inkompletten Antikörper. Mit dem Coombstest war nun die Möglichkeit gegeben, auch schwache Sensibilisierungen, d.h. kleine Antikörpermengen nachzuweisen.
WIENER und SONN (1946) konnten in 2 Fällen von Sensibilisierung im ABO-System die transplacentare Passage von inkompletten mütterlichen Antikörpern nachweisen.
Seit 1946 sind viele Artikel und Monographien über die ABO-Erythroblastose veröffentlicht worden, die mit mehr oder weniger großem Erfolg Licht in dieses Krankheitsgeschehen zu werfen versuchten.

2. Klinisches Bild des Morbus haemolyticus neonatorum im ABO-System.

Am häufigsten erkranken die Kinder am frühzeitig einsetzenden Ikterus, häufig schon am 1. Tag, der meist kräftig ausgeprägt ist aber nur mit geringer Anämie einhergeht (88).
Unter Umständen läßt sich die ABO-Erythroblastose bei geringer Ausprägung zunächst nur durch das frühe Auftreten des Ikterus gegen die physiologische Neugeborenengelbsucht abgrenzen, die gewöhnlich erst am 3. Lebenstag beginnt.
Obwohl der Morbus haemolyticus neonatorum (Mhn) im ABO-System meist milde verläuft, kann er auch wie die Rhesusunverträglichkeit zu einer schweren Hämolyse führen mit der Konsequenz eines excessiven Bilirubinanstiegs mit Encephylophathie und Kernikterus, die zum Tode des Neugeborenen oder zu schweren neurologischen Schäden führen, wenn man nicht eingreift. Deshalb ist es notwendig, diese Krankheit zu diagnostizieren (89). Die Ausreifung der Leberfunktion spielt beim Ausprägungsgrad der Symptome eine große Rolle, denn das Ausmaß der Gelbsucht geht nicht mit dem Ausmaß der Hämolyse parallel. So können Kinder mit einer geringen Hämolyse eine schwere Gelbsucht bekommen und andere mit einer schweren Anämie bewältigen das anfallende Bilirubin (88).
Der Ikterus kann das einzige Symptom sein und frühestens am 2. oder 3. Lebenstag verschwinden. Er kann sich aber auch bis zur 2..Lebenswoche hinziehen.
Eine ausgeprägte Blässe in den ersten Lebenstagen ist ungewöhnlich, da die Anämie bei dieser Krankheit meist minimal ist (89).

Milz und Leber können vergrößert sein.
Der charakteristische Befund im Blutbild ist die Sphärocytose. Sie ist jedoch nicht immer nachweisbar.
Ein Anstieg der Reticulozyten bis zu 25 - 30 % ist nicht ungewöhnlich. Eine Thrombozytopenie, wie sie in schweren Fällen von Rhesus-Erythroblastose auftritt, findet man nicht (89).

Die Erythroblastämie wird bei der ABO-bedingten Erkrankung oft gefunden, doch ist sie kein verlässliches Symptom. Sie wird am sichersten im Nabelschnurblut am 1. Lebenstag festgestellt, während sie vom 3. Lebenstag an kaum noch nachweisbar ist (88).

Vergleicht man den Morbus haemolyticus neonatorum im ABO- und im Rhesus-System, so stellt man fest, daß sich beide Krankheitsbilder im wesentlichen entsprechen. Schwere Krankheitserscheinungen treten bei der ABO-Unverträglichkeit zwar viel seltener auf, aber selbst Hydrops congenitus ist in einzelnen Fällen mit der ABO-Erythroblastose in Zusammenhang gebracht worden (88).

Während Rhesus-Faktor bedingte Fälle von Morbus haemolyticus neonatorum fast immer einem Blutaustausch unterzogen werden müssen, ist dies nur bei etwa einem Fünftel der Fälle einer Unverträglichkeit im ABO-System notwendig (74).
Die Erkrankungsfrequenz ist für diese beiden Erkrankungen fast identisch:
Sie beträgt für die ABO-Erythroblastose 0,685 % und für den Morbus haemolyticus neonatorum im Rh-System 0,626 % (72).
Im allgemeinen ist der Verlauf der ABO-Erythroblastose also gutartig und die schwersten Formen sind im Vergleich zur Gesamtzahl der Erkrankungen recht ungewöhnlich.

3. Pathogenese der ABO-Erythroblastose.

Im Prinzip handelt es sich beim Morbus haemolyticus neonatorum um eine Erkrankung des Neugeborenen, die dann zustande kommt, wenn mütterliche Anti-A/B-Antikörper die roten Blutkörperchen der Frucht zerstören (74).

Es soll in dieser Abhandlung deshalb zuerst auf die Rolle der Placenta und der mütterlichen Antikörper bei dieser Krankheit eingegangen werden.

a) Rolle der Placenta und der Art des Antikörpers, der in den kindlichen Kreislauf übertritt:

WIENER und SONN (1946) fanden, daß die Placenta für komplette Anti-A/B-Antikörper relativ undurchlässig, für die inkompletten Antikörper, die zu einem Anstieg des Agglutinationstiters im Konglutininmillieu führen, jedoch permeabel ist. Sie vermuteten, daß die inkompletten Antikörper so lange die Placenta passieren, bis sich ein Gleichgewicht zwischen der Konzentration im mütterlichen und im fetalen Serum ausgebildet hat. Hätte die Mutter die Blutgruppe O, das Kind die Blutgruppe A, so würde dieses Gleichgewicht relativ schnell von den Anti-B-Antikörpern erreicht werden, während sich die Einstellung eines Gleichgewichts für die Anti-A-Antikörper verzögern müßte, weil sie von den kindlichen A-Blutgruppensubstanzen und A-Gewebsantigenen laufend gebunden würden.

UNGER und WIENER (1945) verglichen an Hand von Mutter-Kind-Serumpaaren den durchschnittlichen Titer an inkompletten Anti-A/B-Antikörpern bei Mutter und Neugeborenem. Sie stellten fest, daß bei Müttern der Blutgruppe O sehr viel mehr inkomplette Antikörper durch die Placenta auf das Kind übergehen als bei Müttern der Blutgruppe A oder B. Die höchsten Titer im Nabelschnurserum wurden bei Neugeborenen der Blutgruppe A, die an einer ABO-Erythroblastose erkrankt waren und deren Mütter die Blutgruppe O hatten, gefunden. Für den Anstieg der Anti-B-Aktivität bei Kindern der Blutgruppe A wurde ein Faktor C verantwortlich

gemacht, ein Antikörper, der sowohl mit A, als auch mit B Erythrocyten reagieren kann. Große Mengen an Anti-C, die von der Mutter auf das Kind übergehen werden als pathogenetisches Agens der ABO-Erythroblastose angesehen.

KOCHWA und Mitarbeiter (1961) konnten zeigen, daß diese inkompletten Antikörper der IgG-Fraktion des Serums angehören. Bei dieser Untersuchung mit DEAE-Cellulose wurde ein Gleichgewicht dieser 7S-Anti-A/B-Antikörper zu beiden Seiten der Placenta nachgewiesen. Es wurde nun postuliert, daß diese 7S-Antikörper die ABO-Erythroblastose verursachen und mit den im Neutralisationstest nicht hemmbaren Immun-Anti-A/B-Antikörpern identisch sind.

Bei der näheren Untersuchung dieser 7S-Antikörper zeigte sich deren serologische Heterogenität. Von den kindlichen Erythrocyten konnten 3 verschiedene serologische Antikörperarten eluiert werden:

Erste Gruppe von Neugeborenen mit ABO-Erythroblastose:
Es werden nur spezifische gegen A oder B Erythrocyten gerichtete Antikörper gefunden.

Zweite Gruppe von Neugeborenen mit ABO-Erythroblastose:
Es können sowohl spezifische als auch kreuzreagierende Antikörper eluiert werden.

Dritte Gruppe von Neugeborenen mit ABO-Erythroblastose:
Man findet nur kreuzreagierende Antikörper (81).

Im Gegensatz zur Theorie des Faktors C wird in dieser Arbeit das Erkrankungsrisiko weniger auf das serologische Verhalten der Anti-A/B-Antikörper als vielmehr auf die Antikörpermenge zurückgeführt, die in den kindlichen Kreislauf gelangt. Das Phänomen der Kreuzreaktion wird mit der ähnlichen biochemischen Struktur der Blutgruppenantigene A und B erklärt.

Die Permeabilität der Placenta ändert sich im Laufe der Schwangerschaft. Der fetale IgG-Serumspiegel steigt

ziemlich kontinuierlich an, um in der 33. Schwangerschaftswoche den der Mutter zu erreichen. Nach der 33. Schwangerschaftswoche laufen beide Spiegel etwa parallel. Die Konzentration an IgG im mütterlichen Serum bleibt während der ganzen Schwangerschaft auf der gleichen Höhe (29, 51).

Mit spektrophotometrischen Methoden war in der Ammionflüssigkeit kein IgM nachweisbar, auch nicht bei solchen Frauen, die hohe Anti-A/B-Antikörper-Titer besaßen und deren Kinder an einer Erythroblastose erkrankten (30). Dies ist ein Beweis für die selektive Permeabilität der Placenta für IgG-Antikörper. Die Placentapassage ist also gewissermaßen eine in-vivo-Fraktionierungsmethode für IgG.

KLUGE (1971) fand mit der 2-Merkaptoäthanol-Technik eine völlige Übereinstimmung der IgG-Anti-A/B-Antikörper-Werte im Nabelschnurblut und im Serum der Mutter (39).

Alle 4 IgG Unterklassen gehen auf den Feten über. Schon in der 16. Schwangerschaftswoche spiegeln ihre relativen Konzentrationen die Verteilung in einem Normalserum. Durch die Bestimmung der Gm-Eigenschaft des IgG bei Mutter-Kind-Serumpaaren konnte die transplacentare Passage des IgG bewiesen werden (51).

Bei diesem Übertritt von IgG handelt es sich um einen aktiven Transportmechanismus (41). Für die Ausreifung eines selektiven Transportmechanismus spricht auch der merkliche Anstieg der fetalen IgG-Serumkonzentration von der 20. bis zur 33. Schwangerschaftswoche (51).

Für die Selektivität soll das Fc-Stück des IgG-Moleküls verantwortlich sein (9).

Den agressiven Antikörpern stehen schützende Faktoren gegenüber.

b) Schützende Faktoren:
In grundlegenden Zügen werden diese Schutzmechanismen schon von TOVEY (1945) beschrieben.

Er nennt drei wesentliche Faktoren:
1. Die Placentarschranke für komplette Antikörper.
2. Die Blutgruppensubstanzen im kindlichen Plasma.
3. Die Unreife der fetalen Erythrocytenantigene.

Die erythrocytären ABH-Antigene liegen in der Hauptsache als Glycolipoide vor. Dabei ist der Saccharidanteil mit den Lipiden der Erythrocytenmembran verknüpft. Bei den löslichen Blutgruppensubstanzen handelt es sich um Glycoproteine, deren Kohlenhydratanteil mit dem der ABH-Antigene identisch ist (79).

Die ursprüngliche Form der Sekretor-Nichtsekretor-Hypothese, wonach das Neugeborene das Sekretor ist, geschützt sein soll, während ein Kind, das in seinen Körperflüssigkeiten keine Blutgruppensubstanzen hat, den Antikörpern der Mutter schutzlos gegenüberstehen soll, war nicht aufrechtzuerhalten. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl Sekretoren, als auch Nichtsekretoren an einer ABO-Erythroblastose erkranken können (86). Man muß also vielmehr von einem relativen Schutz durch die Blutgruppensubstanzen sprechen, der durch große Antikörpermengen, die von der Mutter durch die Placenta das Kind erreichen, durchbrochen werden kann.
Da die Bindung von Antikörpern bei Nichtsekretoren wie auch bei Sekretoren erfolgt, müssen die Gewebezellen bei dieser Antikörperbindung eine erhebliche Rolle spielen (89).
Untersucht man Neugeborene der Blutgruppe A, deren Mütter die Blutgruppe O haben, so findet man im Serum der Kinder ebenso selten Anti-A- wie bei Kindern der Blutgruppe B Anti-B-Antikörper (72).
Das Kind wirkt also gleichsam als Antikörperabsorbens.

Die Antikörperbindungskapazität der löslichen Blutgruppensubstanzen und der antigentragenden Körperzellen ist eine weitgehend unbekannte Größe (67).

Die Ergebnisse von SCHNEEWEIß et al. (1967) sprechen eindeutig für einen sehr wirkungsvollen immunogenen Einfluß kindlicher gelöster Blutgruppensubstanzen, der

fast immer zu einem eindrucksvollen Anstieg der homologen, mütterlichen inkompletten Antikörper führte. Es ist also keineswegs so, daß Sekretorkinder einen besseren Schutz haben als Nichtsekretoren. Da auch Nichtsekretorkinder an einer ABO-Erythroblastose erkranken, müssen neben den löslichen Blutgruppensubstanzen des Kindes noch andere immunogene Einflüsse zu einer Sensibilisierung der Mutter führen (67).
Da es für die IgG-Antikörper ein Gleichgewicht an der Placenta gibt (40) erfolgt ein kontinuierliches Anfluten von IgG-Anti-A/B-Aktivität von der Mutter zum Feten. Die Antikörpermengen, die das Kind bewältigen muß, steigen mit dem mütterlichen Antikörperspiegel an, der wiederum davon abhängt in welchem Ausmaß die Mutter zur Bildung von IgG-Anti-A/B-Antikörpern angeregt wurde (82).

Bei der Rhesusunverträglichkeit konnte gezeigt werden, daß die Antikörperkonzentration im mütterlichen Serum annähernd gleich groß ist wie die Antikörperkonzentration auf den Erythrocyten des Kindes, wenn man sie in mg/ml ausdrückt (35).
Beim Morbus haemolyticus neonatorum im ABO-System sind auf den kindlichen Erythrocyten dagegen viel weniger Antikörpermoleküle nachzuweisen. Dies liegt an der kompetitiven Wirkung der Blutgruppensubstanzen und Gewebeantigene (63). Deshalb kann es auch bei relativ hohen IgG-Anti-A/B-Antikörpern im mütterlichen Serum oft nur zu einer relativ geringen Bindung dieser Antikörper an die kindlichen Erythrocyten mit einem meist negativen direkten Coombstest kommen (27, 63).

Ist das Kind aber erst geboren, so fällt der Spiegel an inkompletten Antikörpern sehr schnell ab. Deshalb kann man bei Neugeborenen, die einige Tage alt sind, oft keine Anti-A/B-Antikörper mehr nachweisen.

Der Unreife der erythrocytären A/B-Antigene der Neugeborenen wird von vielen Autoren eine große Bedeutung beigemessen (12, 22, 76, 82, 89).

Man darf einen weiteren Aspekt nicht außer acht lassen: Die kindlichen Erythrocyten setzen sich aus Populationen mit verschiedenen A/B-Antigenstärken zusammen. Die mütterlichen Anti-A/B-Antikörper, die das Kind über die Placenta erreicht haben, binden sich deshalb in unterschiedlichem Ausmaß an die verschiedenen Erythrocytenpopulationen. Rote Zellen mit einem großen Antikörperbindungsvermögen werden rasch eliminiert, während jene mit einer geringen Bindungskapazität langsamer im RHS abgebaut werden. Individuelle Unterschiede in der Zahl der Erythrocyten mit einer großen Bindungskapazität und im Ausmaß wie diese gebildet werden, machen einen wesentlichen Faktor bei diesem Krankheitsgeschehen aus (22).

Frühgeborene sind meist gut gegen die mütterlichen Anti-A/B-Antikörper geschützt, auch wenn diese in großen Mengen in den kindlichen Kreislauf gelangen. Dies wird mit der Unreife der erythrocytären Antigene der Frühgeborenen erklärt. Doch sind auch Fälle beschrieben, wo frühgeborene Kinder genau so gut entwickelte A/B-Antigene hatten, wie reif geborene Kinder (82).

Die Schutzfunktion der löslichen Blutgruppensubstanzen nimmt zu, wenn die Konzentration der Anti-A/B-Antikörper abfällt. Es kommt zwischen den erythrocytären und den löslichen A/B-Antigenen zu Kompetitionseffekten um den Antikörper, so daß dieser je nach Konzentration und Antigenstärke der Erythrocyten sich eher an die eine oder andere Komponente bindet (33).

Die niedrige Inzidenz von Kindern der Blutgruppe A_2 bei der Erkrankung an der ABO-Erythroblastose, wird durch die geringe Affinität der Anti-A-Antikörper zu den kindlichen A_2-Erythrocyten erklärt (86).

Abweichend vom Konzept KOCHWAS (1961), (40), daß für die IgG-Antikörper zu beiden Seiten der Placenta ein Gleichgewicht besteht, stellten HUGHES-JONES et al. (1971), (35) in ihrem Beitrag zum Morbus haemolyticus neonatorum fest, daß im Rh-System die Anti-D-Menge beim Kind zwischen 2 und 30 % der mütterlichen Antikörpermenge liegt. Sie zogen daraus den Schluß, daß das Ausmaß des transplacentaren Transports an IgG-Anti-D bei der Reaktion der mütterlichen Antikörper mit den kindlichen Erythrocyten den begrenzenden Faktor darstellt. Es wird angenommen, daß es bei den Müttern individuelle Unterschiede in diesem Transfer von Antikörpern in den kindlichen Kreislauf gibt. Dieser Faktor bestimmt laut diesen Untersuchern die Schwere des Krankheitsbildes.

Es ist zu vermuten, daß es auch beim Morbus haemolyticus neonatorum im ABO-System individuelle Unterschiede des placentaren Transportmechanismus gibt. Die verschiedenen relativen Antikörperkonzentrationen im Nabelschnurblut können aber auch durch einen von Fall zu Fall verschiedenen Abbau der Antikörper im kindlichen Kreislauf zustande gekommen sein.

Zusammenfassend kann man den Morbus haemolyticus neonatorum im ABO-System als ein komplexes Wirken von aggressiven und schützenden Faktoren auffassen, die je nach dem welche Seite überwiegt, das klinische Bild dieser Krankheit bestimmen. Es ist also durchaus verständlich, daß ein hoher Antikörperspiegel der Mutter bei einem Überwiegen der kindlichen Schutzfaktoren ohne klinische Konsequenz bleiben kann. Das Neugeborene verfügt in diesem Fall über unreife erythrocytäre Antigene und/oder große Mengen an löslichen Blutgruppensubstanzen und /oder über eine gute Ausreifung von Leber und RHS. Erst wenn die mütterlichen Anti-A/B-Antikörper in so großen Mengen in den kindlichen Kreislauf gelangen, daß die Schutzfunktionen nicht mehr genügen, oder wenn die schützenden Faktoren von vornherein wenig ausgeprägt sind, erkrankt das Neugeborene manifest an einer ABO-Erythroblastose.

c) Sonderstellung der Mütter mit der Blutgruppe O:

Eigentlich wäre zu vermuten, daß das Erkrankungsrisiko bei allen ABO-heterospezifischen Mutter-Kind-Kombinationen gleich groß ist. Eine heterospezifische Schwangerschaft liegt dann vor, wenn das Kind ein Blutgruppenantigen des ABO-Systems aufweist, das an den Blutkörperchen des Kindes nicht vorkommt. Dies tritt in etwa einer von fünf Schwangerschaften auf (69).

Mögliche Konstellationen für eine ABO-Unverträglichkeit:

Blutgruppe der Mutter	Blutgruppe des Neugeborenen
O	A, B
A	AB, B
B	AB, A

ROSENFIELD (1955), (64) untersuchte 1480 Nabelschnurblutproben. Dabei stellte er fest, daß 38 von 39 Müttern, deren Kinder an einer Erythroblastose erkrankt waren, die Blutgruppe O hatten.
Dieser interessanten Tatsache wurde von vielen Untersuchern weiter nachgegangen (3, 14, 24, 26, 27, 36, 39, 40, 72, 80, 84, 89).
An einem Beobachtungsgut von 431 unverträglichen Mutter-Kind-Kombinationen konnte SPEISER (1965), (72) das signifikannte Überwiegen der O-A-Kombination gegenüber den O-B-Fällen zeigen.
Wenn alleine die stärkere Antigenität des Merkmals A gegenüber dem Merkmal B für das überwiegende Erkranken von Kindern mit der Blutgruppe A verantwortlich wäre, müßte man bei der Kombination: Mutter Blutgruppe B, Kind Blutgruppe A oder AB, die gleiche Erkrankungsfrequenz finden. Dies ist jedoch nicht der Fall, weil mehr als 99 % der Mütter, deren Kinder an einer ABO-Erythroblastose erkranken die Blutgruppe O besitzen (89).
WIENER (86) erklärt diesen Umstand mit seiner Hypothese, daß jeder Mensch mit der Blutgruppe O neben den Anti-A/B-Isoagglutininen auch Anti-C-Antikörper bilden kann und

die A- und B-Merkmale auch als Antigen-C fungieren.

Nach neuren Arbeiten ist diese Sonderstellung der O-Mütter weniger an Antikörper mit besonderer serologischer Spezifität, als vielmehr an eine Grundimmunisierung aller Personen der Blutgruppe O, sowohl weiblichen als auch männlichen Geschlechts gebunden (24).

AMES et al. (1964) stellten bei der Untersuchung von 8000 Schwangerenseren fest, daß 98 % der Seren mit inkompletten Antikörpern zur Blutgruppe O gehörten.

Die Existenz großer Mengen an A/B-Antikörpern im Serum von vielen Müttern der Blutgruppe O dürfte auch für den signifikant höheren fetalen Sterbeindex (16 % höher) bei Müttern der Blutgruppe O im Vergleich zu Müttern der Blutgruppe AB eine wesentliche Rolle spielen (14).

Der Nachweis inkompletter Antikörper vom IgG-Typ darf also nicht mehr als besonderes Immunmerkmal angesehen werden, da er bei der Blutgruppe O den Regelbefund darstellt (39).

Die Sensibilisierung kann sich durch den Kontakt mit vielen Substanzen vollziehen. Anti-A- und B-Antigene kommen im Speichel, Urin, den Körperflüssigkeiten und den Geweben des Menschen vor, sind aber auch im Tier und Pflanzenreich weit verbreitet. Ebenso können sie bei bestimmten Bakterien, wie z.B. E. coli und bei Viren nachgewiesen werden (62, 79).
So kommt es, daß die Blutgruppenantigene heute allgemein als heterophile Antigene bezeichnet werden, das heißt, es handelt sich um Antigene, die Affinität zu Antikörpern besitzen, die aufgrund ihrer Herkunft eigentlich nichts mit dem betreffenden Antigen zu tun haben dürften. Die Stimulierung der Isoagglutininproduktion erfolgt durch die blutgruppensubstanzhaltigen Bakterien der Darmflora. Genetisch bedingt ist nur die Fähigkeit Antikörper mit dieser Spezifität überhaupt zu bilden. Die menschlichen

Isoagglutinine sind also heterophile kreuzreagierende Antikörper. Das antigene Stimulans der Bakterien hat mit den erythrocytären Antigenen des Menschen nur zufällig die determinante Gruppe gemeinsam (79).

Eine Sensibilisierung des Menschen kann also auf den verschiedensten Wegen erfolgen, z.B. durch Infektionen mit Mikroorganismen, Transfusionen, Impfungen usw. Besonders Impfstoffe, die in einem Kulturmedium hergestellt werden, das Schweinepepsin enthält, welches meist mit Blutgruppensubstanzen verunreinigt ist, führen zu einer kräftigen Sensibilisierung. Dies ist unter anderem bei den Diphtherie- und Tetanusimpfstoffen der Fall (62). Bei manchen Immunglobulinpräparaten werden bei einer einzigen Injektion bis zu 2 mg Blutgruppensubstanz mitgespritzt (13). Die Stoffe, die Blutgruppensubstanz enthalten, sind noch weitgehend unbekannt. Deshalb ist es nicht möglich zu sagen, wie oft eine Person diesem antigenen Stimulans ausgesetzt war (36).

JAKOBOWICZ et al. untersuchten die Immunantwort bei Rekruten, die gegen Typhus/Paratyphus und Tetanus geimpft wurden. Sie stellten fest, daß sowohl vor, als auch nach der Injektion des Impfserums, das A-Blutgruppensubstanz enthielt, bei den Rekruten der Blutgruppe O, deren Mütter die Blutgruppe A hatten, signifikant kleinere Titer an Immun-Anti-A gefunden wurden, als bei Rekruten, die wie ihre Mütter der Blutgruppe O angehörten (36).
Dies spricht dafür, daß Individuen der Blutgruppe O, deren Mütter die Blutgruppe A oder B besitzen, in utero einen gewissen Grad an Immuntoleranz gegenüber den A/B-Antigenen ausbilden, und bei einem späteren Kontakt mit dem Antigen nur mit einer gedämpften Immunantwort reagieren (36, 43). Es gibt also bei gleichem antigenen Stimulus bei Personen der gleichen Blutgruppe eine individuelle Verschiedenheit der Immunantwort.
Mit A/B-Blutgruppensubstanz vom Menschen, läßt sich eine bessere Sensibilisierung erzielen, als mit Blutgruppensubstanzen tierischen Ursprungs (16). Etwa 80 % der Menschen sind Sekretoren (66).

Ist der Fetus Ausscheider, so kann kindliches Blutgruppen-Antigen in der Decidua vera und basalis, in der Amnionflüssigkeit, in den fetalen Membranen und gelegentlich in den placentaren Villi gefunden werden. Diese gelösten Blutgruppensubstanzen vom Kind können einen sehr wirkungsvollen immunogenen Einfluß auf die Mutter der Blutgruppe O haben. Bei allen Sekretorkindern war ein eindrucksvoller Anstieg der homologen inkompletten mütterlichen Antikörper zu beobachten (67, 85).

SPEISER (1969) gibt die Frequenz der einzelnen Blutgruppenantigene bei der Sensibilisierung der Schwangeren an:

A- und B-Antigene:	63 %
Rh (D)-Antigene:	36 %
restliche Blutgruppenantigene ca.	1 %

Erkrankt in einer Familie ein Kind an einer ABO-Erythroblastose dann werden mit seltenen Ausnahmen alle weiteren Kinder auch erkranken, wenn sie nicht die Blutgruppe O haben (86).
Die von SPEISER (1965) in einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren festgestellte Zunahme der Erkrankungsfrequenz Neugeborener an der ABO-Erythroblastose wird von ihm ursächlich auch auf eine iatrogene Komponente durch die zunehmende parenterale Applikation von Injektabilia zurückgeführt.
Er gibt eine Erkrankungsfrequenz von 0,68 % für die ABO-Unverträglichkeit und von 0,63 % für den Morbus haemolyticus neonatorum im Rh-System an.
Nach den Angaben von BUBE (1966) erkranken 0,5 % der Neugeborenen an dieser Krankheit. Auch er findet die gleiche Häufigkeit bei Rhesus-bedingten Fällen. Betrachtet man die Ergebnisse von VOAK et al. (1969) die eine Erkrankungshäufigkeit von 0,83 % feststellten, wird die von SPEISER beobachtete Zunahme der Inzidenz der ABO-Erythroblastose bestätigt.

4. Allgemeines zur Diagnose der ABO-Erythroblastose:
Die serologische Diagnose der ABO-Erythroblastose stützt sich auf die Feststellung einer unverträglichen Blutgruppenkonstellation zwischen Mutter und Kind und auf den Nachweis von inkompletten IgG-Anti-A/B-Antikörpern im mütterlichen Serum, oder auf den Blutkörperchen des Neugeborenen. Man kann also einen pränatalen Nachweis von Antikörpern im mütterlichen Serum von einer postnatalen Suche nach Sensibilisierungen im ABO-System durch den Nachweis der Antikörper an den kindlichen Erythrocyten oder im Nabelschnurserum unterscheiden.

Sensibilisierungen gegen Faktoren anderer Blutkörperchenmerkmalsysteme des Kindes müssen ausgeschlossen werden (10). Das mütterliche Serum sollte deshalb immer gegen O-Rhesus-positive und O-Rhesus-negative Erythrocyten und vor allem gegen O-Erythrocyten, die Faktoren wie Cw, Kell, Duffy, S und andere Antigene tragen, getestet werden (89).

Während bei der Rhesus-bedingten Erythroblastose der Nachweis der normalerweise nicht vorkommenden Anti-Rhesus-Antikörper im mütterlichen Serum, beim Vorhandensein des entsprechenden Antigens an den kindlichen Blutkörperchen, einen wichtigen Hinweis für die Diagnose gibt, und der Zusammenhang durch die Feststellung der in den Kreislauf des Kindes übergetretenen und an dessen Erythrocyten fixierten Antikörpern gesichert wird, sind die Verhältnisse bei der ABO-Unverträglichkeit wesentlich komplizierter. Der Nachweis mütterlicher, an die kindlichen Erythrocyten gebundenen Antikörper, mit dem direkten Coombstest, läßt in den meisten Fällen von ABO-Erythroblastose im Stich (10, 11, 22, 49, 63, 65).

Nach der Landsteiner'schen Regel entspricht das Vorhandensein der Isoantikörper des ABO-Systems im mütterlichen Serum dem normalen Verhalten (88).
Diese Isoagglutinine deren Nachweis ohne diagnostische Relevanz ist, stören bei der Bestimmung der inkompletten

IgG-Anti-A/B-Antikörper im mütterlichen Serum, weil sie die gleiche serologische Spezifität aufweisen. Erst nach der Erforschung der phsysikalischen und der biochemischen Unterschiede dieser beiden Antikörperarten war man in der Lage die klinische Diagnose bei Neugeborenen durch den serologischen Befund bei der Mutter zu verifizieren.

Um darüber hinaus eine Vorhersage über die Gefährdung des Kindes schon vor der Geburt treffen zu können, benötigt man quantifizierende Methoden, die nicht nur eine Aussage über die Anwesenheit von Immun-Anti-A/B-Antikörpern machen, sondern auch eine Aussage gestatten, ob genügende Mengen an Antikörpern vorhanden sind, um die Schutzmechanismen des Kindes zu durchbrechen (83).

Auf die diagnostischen Verfahren soll nun näher eingegangen werden.

a) Postnatale Diagnostik:
Der Nachweis der inkompletten Anti-A/B-Antikörper wird meist im Nabelschnurblut durchgeführt. Mit dem direkten Coombstest werden inkomplette Anti-A/B-Antikörper, die an die Membran der kindlichen Erythrocyten gebunden sind, nachgewiesen (2). Dabei stören die Isoagglutinine nicht, da sie im Serum des Neugeborenen normalerweise fehlen.

Der direkte Coombstest stellt jedoch nur ein grob orientierendes Verfahren dar, das in den meisten Fällen von ABO-Erythroblastose versagt (10, 11, 22, 49, 63, 65).

ROSENFIELD (1955) fand vor allem bei der O-A-Mutter-Kind-Kombination einen positiven direkten Coombstest.
Da eine gewisse Antikörpermenge auf den kindlichen Erythrocyten gebunden sein muß, nach ROMANO et al. (1973) mindestens 150 Antikörpermoleküle pro roter Zelle, ist dies nur ein Indiz für die Sonderstellung von Müttern mit der Blutgruppe O.

Nur bei dieser O-A-Kombination konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem IgG-Anti-A-Titer der Mutter und einem positiven direkten Coombstest gefunden werden (11). Diese Unzuverlässigkeit des direkten Coombstestes findet verschiedene Erklärungen. Ein schneller Abbau jener Erythrocyten mit einer großen Antikörperbindungskapazität, oder die Unreife der kindlichen erythrocytären Antigene und demzufolge eine geringe Bindung der Antikörper an die Erythrocyten, könnten dieses Phänomen erklären (22).

Vergleicht man Kinder mit positivem und negativem direktem Coombstest, die an einer ABO-Erythroblastose erkrankt sind, so haben jene mit einem positiven direkten Coombstest im Durchschnitt ein niedrigeres Hämoglobin, höhere Retikulocytenwerte und einen höheren Bilirubinspiegel (64).

SPEISER (1965) verwendete bei seinen Untersuchungen einen modifizierten direkten Coombstest. Hier werden das Coombs-Serum in einer Verdünnungsreihe und die Erythrocyten in 20 %iger Aufschwemmung verwendet. Die Ablesung erfolgt nach einstündigem Stehen bei 10 - 12° C. Im positiven Fall sind schwache Agglutinationen zu sehen. Der modifizierte direkte Coombstest ist bei einem unter 50 Neugeborenen, wegen mütterlicher Anti-A/B-Antikörper, bei einem unter 150 Neugeborenen wegen Anti-D-Antikörpern und bei einem unter 2500 - 5000 wegen mütterlicher Antigene der Spezifitäten Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e, Anti-Kell oder Anti-Duffy, positiv. Ein fünftel der Kinder mit positivem modifiziertem direktem Coombstest erkrankt manifest.
Eine weitere Verfeinerung des direkten Coombstests beschreiben TRIPATZIS und BERNDT (1969). Durch die Verwendung von Kapillaren können sie die Empfindlichkeit der Methode von SPEISER weiter verbessern.
RICHON et al. (1970) verwenden bei ihrem modifizierten direkten Coombstest Bromelin. Dies ist ein proteolytisches Enzym aus der Ananaspflanze, durch das die elektrische Ladung der roten Blutzellen herabgesetzt wird und die

antigenen Bindungsstellen auf der Erythrocyten-membran freigelegt werden. Dadurch kommt es zu einer stärkeren Agglutination der Erythrocyten.
HSU et al. (34) modifizierten den direkten Coombstest, indem sie die Reaktion der Erythrocyten mit Coombsserum in Gegenwart von K-90 Polyvinylpyrrolidon durchführten.

Elution der mütterlichen Antikörper:

Um die Unreife der kindlichen erythrocytären A/B-Antigene zu umgehen, kann man die mütterlichen Antikörper von den Erythrocyten des Kindes abspalten und mit Erythrocyten von Erwachsenen nachweisen. Die an den in physiologischer Kochsalzlösung suspendierten Erythrocyten sitzenden Antikörper werden durch Hitzeeinwirkung abgesprengt. Nachdem man zentrifugiert hat, kann man durch Inkubation des Überstands mit Erythrocyten von Erwachsenen im Coombstest die mütterlichen Anti-A/B-Antikörper nachweisen (2, 81).
Ein schonenderes Verfahren stellt die Elution der Antikörper durch A/B-Blutgruppensubstanz dar. Dabei werden die Antikörper kompetitiv von den erythrocytären Rezeptoren verdrängt und können anschließend mit dem indirekten Coombstest nachgewiesen werden (3).

b) Pränatale Diagnostik:

Die pränatale Diagnostik des Morbus haemolyticus neonatorum im ABO-System ist deshalb von besonderer Bedeutung, weil mit ihrer Hilfe schon vor der Geburt des Kindes dessen Erkrankungsrisiko erfaßt werden kann. Durch eine adäquate postnatale Überwachung solcher, durch einen hohen mütterlichen Spiegel an inkompletten Anti-A/B-Antikörpern gefährdeten Neugeborenen, ist es dann möglich rechtzeitig die Indikation zur Austauschtransfusion zu stellen (57).

Bestimmung des Isoagglutinintiters:

Das Serum wird in physiologischer Kochsalzlösung titriert. Nachdem man Testerythrocyten zugegeben hat wird bei Zimmertemperatur inkubiert und danach geprüft, ob eine Agglutination zu sehen ist.

Mit dieser groben Methode stellte man fest, daß bei einer heterospezifischen Schwangerschaft ein merklicher Anstieg des zur Blutgruppe des Kindes korrespondierenden mütterlichen Isoagglutinintiters zu verzeichnen ist (69, 86). Bei Müttern der Blutgruppe O war gegen Ende der Schwangerschaft ein geringer Anstieg auch des anderen Agglutinintiters zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu war es bei homospezifischen Schwangerschaften in der Regel so, daß dieser Anstieg des Isoagglutinintiters fehlte (69).
JUNGWIRTH (37) untersuchte mit dieser Methode Mutter-Kind-Serumpaare von homo- und heterospezifischen Schwangerschaften. Er stellte bei homospezifischen Schwangerschaften (Mutter O, Kind O) eine 4- bis 32-fache Titerreduktion der Agglutinine im kindlichen Serum fest, während bei einer heterospezifischen Schwangerschaft der Titer der kindlichen Agglutinine weniger als 1/100 des mütterlichen Wertes betrug. Agglutinine im Serum des Kindes konnte JUNGWIRTH nur bei einem hohen mütterlichen Isoantikörperspiegel nachweisen. Bei diesen Agglutininen im kindlichen Serum handelte es sich, wie man heute weiß, um IgG-Anti-A/B-Antikörper.
Bei etwa einem Drittel der unverträglichen Mutter-Kind-Kombinationen fanden WIENER et al. (1960) für die Anti-A- und Anti-B-Isoantikörper den gleichen mütterlichen Serumtiter. Sie stellten die Vermutung an, daß in solchen Fällen die Antikörper als Antwort auf artfremde antigene Stimuli gebildet wurden.
Sie stellten fest, daß bei Müttern der Blutgruppe O, deren Kinder an einer ABO-Erythroblastose erkrankten, der Titer der Anti-A/B-Isoantikörper deutlich erhöht war. Sie konnten zwischen dem Antikörpertiter und der Schwere der Krankheit Parallelen aufzeigen (86).

Gleichzeitige Austitrierung des mütterlichen Serums sowohl bei 37° C als auch bei Zimmertemperatur (8):
Bei dieser Methode wird das unterschiedliche Temperaturoptimum von Isoantikörpern und Immunantikörpern ausgenützt. Die inkompletten IgG-Anti-A/B-Antikörper haben

ihr Reaktionsoptimum bei 37° C, während die Isoantikörper bei Zimmertemperatur oder noch tieferen Temperaturen am besten reagieren (79, 89).

VOAK et al. fanden bei der vergleichenden Titration des Serums bei 37° C und bei 4° C mit zunehmender Schwere des Krankheitsbildes, einen signifikanten Anstieg der Seren, die bei der Titration bei 37° C einen höheren Titer aufwiesen als bei 4° C.

Vergleichende Untersuchung des Antikörpertiters im Kochsalz und im Konglutininmilieu:
Dabei wird eine Titerdifferenz von zwei Stufen für den Nachweis inkompletter Anti-A/B-Antikörper als beweisend angesehen (49,85).

Hitzeresistenztest:
Die Dauer der Hitzeeinwirkung muß der Inkubationstemperatur angepaßt werden. Sie beträgt größenordnungsmäßig bei 60° C Stunden und bei 70° C Minuten. KLUGE (1971) bekam bei einer Inkubation des Serums bei 70° C für 10 min. die besten Ergebnisse. Er gibt einen kombinierten Test an:
Im Hitzeresistenztest werden die Isoantikörper zerstört. Die noch vorhandene IgM-Aktivität wird durch Einwirkung der Protease Bromelin selektiv zerstört. Die placentagängigen IgG-Anti-A/B-Antikörper werden danach im indirekten Coombstest nachgewiesen (39).
SKRZYPULEC erhitzt das Serum 20 min. auf 70° C (68). Durch dieses Verfahren werden die natürlichen Anti-A/B-Isoantikörper zerstört, während die inkompletten Antikörper hitzestabil sind.
Wie HASEKURA (1974) jedoch zeigen konnte, verlieren die IgM-Antikörper ihre Aktivität fast vollständig, die IgG-Fraktion wird signifikant vermindert, während die IgA-Antikörper die beste Stabilität aufweisen.

Neutralisation der Isoantikörper:
Durch Zusatz von A- bzw. B-Blutgruppensubstanz nach WITEBSKY (1948) oder von A- bzw. B-Ausscheidespeichel zum zu untersuchenden Serum, werden die kompletten (IgM)-

im Gegensatz zu den inkompletten (IgG)-Antikörpern gebunden und unwirksam gemacht. In der nachfolgenden Austitrierung des so vorbehandelten Serums ist meist keine oder nur eine geringe Aktivität der kompletten, aber gewöhnlich ein starker, über mehrere Verdünnungsstufen reichender Nachweis der inkompletten Antikörper möglich.
Der Titer der inkompletten Antikörper kann mit Supplement oder mit dem indirekten Coombstest bestimmt werden.

Auf diesem Prinzip beruht im Wesentlichen der von FISCHER und LURATI (1959) beschriebene AB-Gamma-Test. Die inkompletten Antikörper werden nach der Neutralisation mit Blutgruppensubstanz im indirekten Coombstest nachgewiesen. Als Immunantikörper werden nur jene inkompletten Antikörper bezeichnet, deren Reaktion mit Coombsserum durch Gammaglobulin gehemmt wird. Dies beruht auf der Beobachtung, daß durch Zusatz von reinem Gammaglobulin zum Coombsserum die Reaktion des Coombs-Serums mit inkompletten Antikörpern vom Wärme-Typ gehemmt wird, während die gegen inkomplette Kälteantikörper (Kälte-Typ) gerichtete Antiglobulinfraktion unbeeinflußt weiterreagiert. Diese Kälte-Antikörper sollen beim Test nicht berücksichtigt werden, d.h. eine positive Reaktion liegt nur dann vor, wenn im indirekten Coombstest bei mindestens einer Serumverdünnung die Reaktion durch Gammaglobulin gehemmt wird (21).
ZUELZER (1957) gibt folgende Definition der Immunantikörper:

- Temperaturoptimum bei 37° C.
- Größere Hitzeresistenz als die Isoagglutinine beim Erwärmen.
- Mit Konglutinin findet man höhere Titer als bei der Titration in physiologischer Kochsalzlösung.
- Resistenz gegenüber den Blutgruppensubstanzen A und B.
- Hämolyse und Komplementbindung in vitro (89).

Seit der Entdeckung WITEBSKYS (1948) sind eine Reihe anderer komplettierender Substanzen gefunden worden, z.B. Albumin, Gelatine, Gummi arabicum, Dextran und Polyvinylpyrrolidon (52).
MUNK-ANDERSEN (1956) untersucht in seiner Arbeit die Anwendbarkeit von Dextran zum Nachweis inkompletter Antikörper im ABO-System. Dabei werden Testerythrocyten, die an ihrer Membran Anti-A/B-Antikörper gebunden haben, durch Zusatz einer 6 %igen Dextranlösung zur Agglutination gebracht (52).

Gelfiltration:
Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der Wirkung des Gels als Molekularsieb, während mit stärker vernetzten Gels (Sephadex G-25, G-50, G-75) eine Trennung von Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von 50 000 möglich ist, kann man mit Sephadex G-200 auch Proteine fraktionieren.
Diese Gele bestehen aus quer vernetztem Dextran und werden von der Firma AB Pharmacia, Uppsala (Schweden) hergestellt. Das kreuzvernetzte Dextran wird in Form von Kugeln hergestellt.
Mit abfallender Sedimentationskonstante, also kleiner werdenden Molekulargewicht, nimmt der Grad mit dem ein Protein in den Maschen des Gels zurückgehalten wird zu. Serum läßt sich, auf diesem Prinzip aufbauend, in drei Fraktionen auftrennen:

Fraktion I: hauptsächlich α_2- und β_2 -Makroglobuline und 19 S-Antikörper.
Fraktion II: 7 S-Antikörper.
Fraktion III: Albumin.

Es handelt sich um eine relativ einfache und wenig störanfällige Methode (23, 55).

Chromatographie von Serumproteinen mit dem Anionenaustauscher DEAE-Cellulose:
Die Chromatographie von Proteinen wird durch mehrere Faktoren kompliziert, die bei der Chromatographie einfacherer Moleküle von untergeordneter Bedeutung sind. Einer dieser

Faktoren liegt in der Größe der Proteinmoleküle. Eine Auftrennung auf der Basis des Molekularsiebeffekts war deshalb, vor der Herstellung gering vernetzten Dextrans (Sephadex G-200), unmöglich. Ein anderer Faktor ist die Instabilität der Proteinmoleküle, die die Wahl der Lösungsmittel begrenzt und ein Vorgehen bei niedriger Temperatur und innerhalb eines begrenzten ph-Bereichs erforderlich macht. Betrachtet man weiterhin die Komplexität dieser Polyelektrolyte, so ist zu erwarten, daß die Spanne der Bedingungen, zwischen der eine Absorption oder eine Eluation der Proteinmoleküle erfolgt, sehr eng ist. Während die Absorption der Proteinmoleküle bei niedrigen Salzkonzentrationen optimal ist, wird die Eluation vom Austauscher durch ansteigende Salzkonzentrationen und/oder durch eine Änderung des ph begünstigt. Die Hauptbedeutung des ph liegt in der Beeinflussung der Ladung des Proteins. Höhere Salzkonzentrationen fördern die Dissoziation der elektrostatischen Bindungen, die sich zwischen Protein und Ionenaustauscher ausgebildet haben.

Auf der Grundlage von Cellulose können verschiedene Austauscher hergestellt werden, indem man die Halogenderivate von sauren oder basischen Gruppen mit in Alkali gequollener α -Cellulose reagieren läßt.
Man erhält auf diese Weise DEAE-Cellulose DEAE =(Diäthylaminoäthyl), TEAE-(= Triäthylaminoäthyl), ECTEOLA-Cellulose (ein komplexes Produkt unter Verwendung von Epichlorhydrin und Triäthanolamin), SE-(= Sulfäthyl) oder CM-(= Carboxymethyl Cellulose.
SOBER und PETERSEN (1958) beschrieben die Chromatographie der Serumproteine mit DEAE-Cellulose in möglichst viele Fraktionen durch ein kontinuierliches Ansteigen der Ionenstärke und einen langsamen Abfall im ph des eluierenden Puffers.
Dieses Verfahren benötigt pro Serum einen Zeitaufwand von mindestens einem Tag.

Um das Verfahren abzukürzen und zu vereinfachen, kann man auch eine stufenweise Eluation durchführen. Es handelt sich dann jedoch nicht mehr um eine Chromatographie der Serumproteine, sondern man sollte eher von einer Auftrennung in verschiedene Fraktionen sprechen. Es ist gewagt, die "Chromatogramme", die so entstehen zu interpretieren, weil bei jedem Wechsel des eluierenden Puffers ein Arteffekt (Peak im Chromatogramm) entsteht.

Die stufenweise Trennung eignet sich zur Abtrennung von Gamma-Globulin, denn wenn das Serum bei geeignetem ph und Salzkonzentration des Puffers bearbeitet wird, binden sich alle Proteine außer den Gamma-Globulinen fest an den Ionenaustauscher (70).

Prinzip der Auftrennung von IgG aus dem Serum:

a) Beschickung der Säule mit Serum.
b) Gewinnung der IgG-reichen Fraktion.
c) Nachweis des IgG oder der Antikörper, die dieser Fraktion angehören.

Die Untersuchung von IgG- und IgM-Antikörpern mit 2-Merkaptoäthanol:
Durch Inkubation von 2-Merkaptoäthanol und von Serum, das sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper enthält, werden die Disulfidbrücken der IgM-Antikörper selektiv gespalten. Dadurch verlieren die IgM-Antikörper ihre serologische Aktivität (61).
Die IgG-Antikörper können sodann im indirekten Coombstest nachgewiesen werden.

PIROFSKY et al. (1974) beschrieben ein ähnliches Verfahren. Anstelle von 2-Merkaptoäthanol verwenden sie Dithiothreitol (DTT). DTT zerstört selektiv die serologische Aktivität der IgM-Antikörper, die IgG-Aktivität bleibt gleich. Die mit ihrer Methode erzielten Testergebnisse sind mit denen identisch, die man unter Verwendung von 2-Merkaptoäthanol erhält. Dialyse des Serums, lange Inkubationszeit und schlechter Geruch der 2-Merkaptoäthanol-Technik werden umgangen (56).

Aufbauend auf der Arbeit von SOBER et al. entwickelte STANWORTH (1960) eine Methode, die es erlaubte Gamma-Globulin vom 7 S-Typ schnell und mit einem hohen Grad an Reinheit darzustellen. Er verwendete dazu den Anionenaustauscher DEAE-Cellulose und entwickelte ein Batch-Verfahren, das sich der sonst gebräuchlichen Säulenchromatographie mit DEAE-Cellulose als überlegen erwies, weil es weniger Zeit beanspruchte und einfacher durchzuführen war. Es handelte sich also nicht mehr um eine zeitraubende stufenweise Eluation, sondern um eine "Ein-Schritt-Methode". Bei diesem Verfahren wird dialysiertes Serum tropfenweise in die DEAE-Cellulose eingerührt und mit ihr 5 Std. inkubiert. Danach wird 15 min. bei 3000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand enthält hochgereinigtes Gamma-Globulin (75).
Von BAUMSTARK et al. (1963) wurde dieses Verfahren aufgegriffen, um Pancreaspeptidase E zu reinigen. Die Inkubationszeit verkürzten sie auf 1,5 Std. (5).

Aufbauend auf diesen Erfahrungen beschrieben sie (1964) ein Verfahren, das es gestattet unter Verwendung von DEAE-Sephadex A-50 7 S-Gamma-Globulin aus menschlichem Serum schnell abzutrennen. Sie fanden bei ph 6,5 eine optimale Trennung und Isolierung der Gamma-Globuline. Durch die Puffereigenschaften des vorbereiteten Gels ändert sich das ph bis zu einer Relation von 7 ml Serum pro 1 g Sephadex kaum. Alle Serumproteine mit Ausnahme der Gamma-Globuline werden, sofern man die Reaktionsbedingungen einhält, an das Gel gebunden. Mit diesem Verfahren ist es nun möglich aus undialysiertem Serum durch eine einfache und schnelle Batch-Methode Gamma-Globulin zu isolieren. BAUMSTARK et al. verwendeten die Chloridform von DEAE-Sephadex A-50. Mit der Immunelektrophorese und der Ultrazentrifuge konnte ein hoher Grad an Homogenität des IgG-Überstands nachgewiesen werden (6).

DEAE-Sephadex A-50 ist wie die übrigen Sephadex Gele ein dreidimensional vernetztes Polysaccharid, das durch Quervernetzung von Dextranketten erhalten wird. Sephadex ist

indifferent gegenüber Kationen und Anionen, enthält viele Hydroxylgruppen (daher große Hydrophilie), quillt stark in Wasser und bildet ein Gel mit einer Vielzahl von Poren, deren Größe vom Vernetzungsgrad abhängt.
Aus diesem Grund eignet es sich als Matrix für Ionenaustauscher wobei als funktionelle Gruppe DEAE-, CM-, Diäthyl-2-hydroxyl-propylaminoäthyl-(QAE-Typ) oder SP- (sulfopropyl-) Gruppen eingeführt werden.
A-50 bedeutet, daß es sich um einen Anionenaustauscher mit einer Teilchengröße von ca. 50 mesh handelt.
50 - 100 mesh $\hat{=}$ 0,29 - 0,1 mm.

$\frac{16}{\text{mesh}}$ = Kugeldurchmesser in mm (42).

Die Kugelgröße von DEAE-Sephadex A-50 beträgt 0,04 - 0,12 mm.

Durch die Arbeit von WEBB (1972) erfuhr das von BAUMSTARK et al. (1964) beschriebene Verfahren eine weitere Vereinfachung. Dadurch wurde sein Einsatz in vielen Bereichen zu Routineuntersuchungen möglich.
Nach seinen Vorschriften kann die IgG-Aktivität mit guter Ausbeute aus nicht dialysiertem Serum in weniger als 30 min. isoliert werden. Dabei wird eine bestimmte Menge Serum mit einer bestimmten Menge vorbereitetem DEAE-Sephadex A-50 Gel einige Minuten lang vermischt. Danach zentrifugiert man 1 min. bei 1000 U/min. Im Überstand befinden sich sodann die IgG-Antikörper, die im indirekten Coombstest nachgewiesen werden. Bei fast allen Untersuchungen war es nicht nötig, die verdünnten IgG-Fraktionen auf das Ausgangsvolumen des Serums zurückzukonzentrieren (84).
Die Verdünnung des Serums kommt dadurch zustande, daß das Gel beim Vermischen mit dem Serum schrumpft und dadurch eine erhebliche Menge an Wasser aus dem Gel ausgepresst wird. Durch das Isotonisieren des Überstands muß man eine weitere Verdünnung in Kauf nehmen.
Pro ml Serum muß man genügend Gel bemessen, weil es bei einem Übermaß an Serum zu einer starken Schrumpfung des Gels und in Verbindung damit zu einer unvollständigen Trennung der Serumproteine kommt. Die IgG reiche Fraktion, also der Überstand, war farblos, da die gefärbten Serum-

eiweiße vom Gel absorbiert wurden. Befand sich Hämoglobin im Serum, so erschien dies ebenfalls im Überstand. Der Verlust an Antikörperaktivität wird von WEBB mit ca. 20 % angegeben. Durch diese Methode wird die benötigte Zeit von 3 Std. auf etwa 30 min. reduziert (84).
IgM und IgA waren im gereinigten IgG mit der Agar-Diffusion der Microelektrophorese nicht mehr nachweisbar. Die sehr scharfe Trennung einer hochtitrigen Anti-IgM-Aktivität von einem hohen Titer an Anti-Rhesus-IgG bestätigte die Effektivität dieser Methode. Die Anti-A und Anti-B-Aktivität im Nabelschnurserum war immer auf die IgG-reiche Fraktion beschränkt. Deshalb ist diese Methode für die Trennung und Quantifizierung der, beim Krankheitsgeschehen der ABO-Erythroblastose pathogenetisch wichtigen Anti-A und Anti-B-Antikörper geeignet (84).

Suche nach Hämolysinen:
Die Abwesenheit von Hämolysinen bei der Mutter schließt eine ABO-Erythroblastose weitgehend aus, da ein merklicher Anstieg von IgG Anti-A/B-Antikörpern immer von Hämolysinen begleitet wird (20).
Der Nachweis von Hämolysinen eignet sich deshalb als Voruntersuchung, ob eine Immunisierung der Mutter vorliegt.
Mit diesem einfachen Test können annähernd 50 % der Mütter, die auf eine Sensibilisierung untersucht werden, ausgeschlossen werden (3, 20).

5. Therapie des Morbus haemolyticus neonatorum:
Milde Verlaufsformen dieser Erkrankung können mit der Phototherapie behandelt werden.
Seit ihrer Einführung in die Therapie im Jahre 1944 hat die Austauschtransfusion in der Behandlung des intensiven Ikterus beim Neugeborenen als einzige wirksame Methode ihren Platz beibehalten. Die Austauschtransfusion wird mit 0 (D)-Rhesus-positivem Blut durchgeführt (47).
Was die Menge des Blutes anbelangt, so gilt die Faustregel, daß bei guter Verträglichkeit das zweieinhalb-

fache der Gesamtmenge des Neugeborenenblutes auszutauschen sei, oder 170-330 ml/kg (53).
Nach den meisten Autoren besteht die Gefahr des Kernikterus bei einer Serumbilirubinkonzentration von 20 mg% und darüber.
Bei der Entscheidung zur Austauschtransfusion gibt es zwei Möglichkeiten (57).

a) Präventives Verfahren: Frühzeitige Durchführung der Austauschtransfusion kurz nach der Geburt bei einem noch relativ niedrigen Bilirubinspiegel. Dadurch werden die fetalen, durch die mütterlichen Antikörper geschädigten Blutkörperchen beseitigt und eine intensive Bilirubinbildung verhindert. Die Ausschwemmung des bereits gebildeten Bilirubins ist dabei von sekundärer Natur.

b) Abwartendes Verfahren: Laufende Kontrolle der Bilirubinwerte und Indikation zur Austauschtransfusion, sobald sich die Bilirubinkonzentration dem gefährlichen Grenzwert nähert. Ziel ist ein Austausch der Erythrocyten und eine Beseitigung des gebildeten Bilirubins. Wiederholte Austauschtransfusionen werden ausschließlich zu diesem Zweck durchgeführt.
Das abwartende Verfahren ist bei Grenzfällen unerlässlich, zu denen die meisten Fälle des Morbus haemolyticus neonatorum im ABO-System zählen.
Der Nachteil einer späten Durchführung einer Austauschtransfusion besteht darin, daß der ganze Organismus hochgradig mit Bilirubin gesättigt ist. Nach KEUTH (1959) steigt deshalb nach Beendigung der Austauschtransfusion der Spiegel dieses Pigments wieder rasch an, insbesondere bei Kindern mit niedriger Exkretionsfähigkeit. Der steilste Anstieg erfolgt in den ersten 20 - 30 min. nach der Austauschtransfusion. Innerhalb von 2 - 3 Std. nach Ende der Austauschtransfusion scheinen die Ausgleichsvorgänge zwischen extra- und intravasalem Bilirubin beendet zu sein. Das optimale Intervall für unterteilte Austauschtransfusionen liegt demnach bei 2 - 3 Std. und darüber. Das neue Maximum nach

Abschluß der Ausgleichsvorgänge liegt zwischen 65 und 95 % des Ausgangswertes (38). Dies bedeutet dann erneut die Gefahr des Kernikterus (57).
POLACEC (1963) gibt eine Kurve an, die eine sogenannte Beobachtungszone einschließt, bei deren Überschreitung die Indikation zur Austauschtransfusion in den ersten 120 Stunden abgelesen werden kann.
Im allgemeinen ist die Austauschtransfusion bei jenen Fällen angezeigt, bei denen mit größter Wahrscheinlichkeit aus dem Bilirubinanstieg vorausgesetzt werden kann, daß der Bilirubinwert spätestens bis zum Ende des 3. Lebenstages den Grenzwert von 20 mg% überschreiten wird. Da die ABO-Unverträglichkeit meist einen milden Verlauf nimmt mit einer frühzeitigen Abflachung der Bilirubinkurve, empfiehlt sich ein abwartendes Verfahren und laufende Kontrollen der Bilirubinwerte an Hand des Diagramms (57).

B. Aufgabenstellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, das Sensibilisierungsniveau eines nicht selektiven Schwangerenkollektivs und von 27 Seren von Müttern, deren Kinder klinische Symptome einer ABO-Unverträglichkeit hatten, zu bestimmen.
Als Vergleichspopulation soll eine Gruppe von nichtschwangeren Spenderinnen dienen, bei der in einer parallelen Arbeit mit der gleichen Methode die IgG-Anti-A/B-Antikörperkonzentration bestimmt wurde (92).
Es wird untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Höhe des IgG-Anti-A/B-Antikörpertiters und der klinischen Manifestation einer ABO-Erythroblastose besteht.

1) Untersuchungsgut:

Untersucht wurden die Seren von 508 schwangeren Frauen, die im Rahmen der Schwangerenvorsorgeuntersuchung in die Abteilung für das Transfusionswesen der Universitätskliniken Tübingen eingesandt wurden.
Die eingesandten Seren stammten sowohl von erst- als auch von mehrgebährenden Frauen. Da die Angaben über die Zahl der Schwangerschaften und die Schwangerschaftswoche nur bei einem Teil der Seren verfügbar waren, konnten nicht alle Seren unter diesen Gesichtspunkten ausgewertet werden.
Bei etwa 50 % der Seren war die ABO-Blutgruppe noch nicht bestimmt worden. Bei diesen Seren wurden die Serumeigenschaften gegen A_1^-, B- und O-Erythrocyten festgestellt.
Jede Serumprobe wurde in ein Plastik-GPT-Röhrchen pipettiert, numeriert und bei -20° C eingefroren.
Für jede Probe wurde eine Karteikarte angelegt, auf deren Vorderseite alle wichtigen verfügbaren Daten der Schwangeren notiert wurden:

1. Name und Adresse,
2. behandelnder Arzt,
3. Blutgruppe,
4. Schwangerschaftswoche,
5. Erstgebährende bzw. Mehrgebährende.

Auf der Rückseite der Karten wurden die Untersuchungsergebnisse der Hämolysinbestimmung und des Batch-Verfahrens notiert.
Damit ist es möglich, aufbauend auf diese Untersuchung, Nachforschungen über klinische Auswirkungen hoher IgG-Anti-A/B-Titer anzustellen.

Verteilung der 508 untersuchten Seren auf die Blutgruppen A, B und 0:

Blutgruppe 0:	240 Seren	=	47,24 %
Blutgruppe A:	209 Seren	=	41,14 %
Blutgruppe B:	59 Seren	=	11,62 %

2) Methodik:

a) Suche nach Hämolysinen bei Schwangeren der Blutgruppen A, B und 0:

Als technisch einfache Untersuchung wurde bei jedem Serum vor der Bestimmung der IgG-Anti-A/B-Antikörper der Hämolysintest durchgeführt.
Dieser Test wird von verschiedenen Autoren als Screening-Methode empfohlen, um, sofern man eine hämolytische Aktivität des untersuchten Serums findet, den Nachweis inkompletter Anti-A/B-Antikörper anzuschließen (3, 20, 48, 83). Diese Untersucher setzen voraus, daß die Abwesenheit von Hämolysinen im mütterlichen Serum eine Erkrankung des Neugeborenen an einem Morbus haemolytikus neonatorum im ABO-System weitgehend ausschließt. Es wird angenommen, daß ein merklicher Anstieg von IgG-Anti-A/B-Antikörpern immer von Hämolysinen begleitet ist (20).
Da Anti-A/B-Hämolysine mit empfindlichen Methoden jedoch in den meisten Fällen einer heterospezifischen Schwangerschaft nachzuweisen sind, empfiehlt FISCHER (1971) eine relativ umempfindliche Nachweismethode zu verwenden. Durch dieses Verfahren können annähernd 50 % der Seren ausgeschlossen werden, d.h. es wird präjudiziert, daß nur Neugeborene an einer ABO-Erythroblastose erkranken

können, bei deren Müttern Hämolysine im Serum nachzuweisen sind (3, 20, 83).
Beim Morbus haemolyticus neonatorum im ABO-System spielen die mütterlichen 7 S-Anti-A/B-Antikörper (IgG) eine pathogenetisch wichtige Rolle, weil sie im Gegensatz zu den 19 S-Anti-A/B-Antikörpern (IgM) die Placenta passieren und in den kindlichen Kreislauf übertreten können (40). Sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper können eine hämolytische Aktivität entfalten (20, 50).
MOLLISON (1970) stellte fest, daß Zellen die in Abwesenheit von Komplement reversibel agglutiniert sind, nach der Transfusion eine normale Überlebenszeit haben. Auf der anderen Seite ist die Bindung von Antikörpern an die Rezeptoren der Zellmembran im Allgemeinen von einer Aktivierung des Komplementsystems gefolgt. Dadurch werden an den Erythrocyten Membranläsionen hervorgerufen. Ein einziges IgM-Molekül, das sich an einen Erythrocyten bindet, genügt, um die Komplementaktivierung in Gang zu bringen und die Zelle zu lysieren. Dagegen müssen zwei IgG-Moleküle an angrenzenden antigenen Bindungsstellen der Membran gebunden werden, um die Komplementaktivierung in Gang zu setzen. Nimmt man eine gleichmäßige Verteilung der Rezeptoren an, so müssen also sehr viele IgG-Moleküle gebunden werden, bis zufällig zwei benachbarte Bindungsstellen besetzt werden. Sind diese Vorgänge der Antikörperbindung und Komplementaktivierung abgelaufen, so erfolgt eine ausgedehnte Zellschwellung. Die Zellen verlieren dann die meisten ihrer Makromoleküle. Das aus den Erythrocyten austretende Hämoglobin färbt dann das Serum rot (28).
Da die gesammelten Seren von Schwangeren durch den Transport oft einige Tage unterwegs waren und da sie bei -20° C eingefroren und maximal 3 Monate gelagert wurden, mußte der Verlust an Komplement ausgeglichen werden, weil eine Immunhämolyse in vitro immer Komplement benötigt (25). Deshalb erfolgte die Titration der Seren in frischem AB-Serum.

Da einige Seren durch den Transport leicht hämolytisch waren, wurde für jedes Serum ein Leerwert mit Erythrocyten der Blutgruppe O mitgeführt.
Um Antikörper des Rhesus- und Kell-Systems nicht zu erfassen wurden Rhesus- und Kell-negative Testerythrocyten verwendet.

Hämolysinbestimmung:

1. Gewinnung und Prüfung des AB-Serums:

Das von 2 Spendern frisch entnommene Blut der Blutgruppe AB läßt man bei Zimmertemperatur gerinnen und wartet, bis sich das Fibrin retrahiert hat. Dann werden die Konserve zentrifugiert und das Serum abgezogen.
Dieses frische AB-Serum wird nun auf seinen Gehalt an A- bzw. B-Blutgruppensubstanz untersucht:
Zuerst wird der Isoagglutinintiter eines gepoolten O-Serums in physiologischer Kochsalzlösung bestimmt.

Ergebnis: Anti-A: 1 : 512
Anti-B: 1 : 128

Mit 0,9 %iger NaCl-Lösung stellt man nun eine Verdünnung dieses gepoolten O-Serums von 1 : 16 her.
Danach werden folgende Ansätze in Coombsröhrchen pipettiert:

Ansätze 1 und 2: je 0,1 ml gepooltes O-Serum 1 : 16 verdünnt + 0,1 ml frisches AB-Serum.

Ansätze 3 und 4: je 0,1 ml gepooltes O-Serum 1 : 16 verdünnt + 0,1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung.

Die 4 Coombsröhrchen inkubiert man sodann 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Dann stellt man für jedes Röhrchen eine Titerreihe in 0,9 %iger NaCl-Lösung bis zu einer Verdünnung von 1 : 2048 her.
In die Teströhrchen der Verdünnungsreihen der Ansätze 1 und 3 gibt man je 1 Tropfen einer 5 %igen Suspension von A_1 Erythrocyten.

In die Teströhrchen der Verdünnungsreihen der Ansätze 2 und 4 gibt man je 1 Tropfen einer 5 %igen Suspension von B-Erythrocyten.

Die Röhrchen werden danach 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert und dann 1 min. bei 1000 U/min. zentrifugiert und bei kleinster Vergrößerung (ca. 24-fach) unter dem Mikroskop abgelesen.
Ergebnis:

Titerstufe von Röhrchen	1:	1 : 512
" " "	3:	1 : 512
" " "	2:	1 : 128
" " "	4:	1 : 128

Das AB-Serum enthält also keine Blutgruppensubstanzen.

2. Versuchsansatz:

Durch eine Reihe von Vorversuchen mit hämolysierenden Schwangerenseren der Blutgruppe O erwies sich folgendes Verfahren als das geeignetste:

a. Herstellung einer 20 %igen Erythrocytensuspension:

Die verwendeten A_1, B und O-Erythrocyten werden 3mal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und danach eine 20 %ige Suspension hergestellt.
Um möglichst empfindliche Erythrocyten zu verwenden wurden 4 Spenderkonserven der Blutgruppe A_1 und 4 Konserven der Blutgruppe B mit einem stark hämolysierenden Serum der Blutgruppe O auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Anti-A/B-Hämolysinen untersucht.
Diejenigen Erythrocyten der Blutgruppe A bzw. B mit denen das O-Serum die beste hämolytische Reaktion ergab, wurden für die Untersuchung sämtlicher 508 Schwangerenseren der Blutgruppen A, B und O auf Hämolysine verwendet.

b. Versuchsansatz bei den 240 Seren von Schwangeren der Blutgruppe O:
Im ersten Schritt der Hämolysinbestimmung benötigt man für jedes Serum 5 Ansätze. Verwendet wurden Plastik-

coombsröhrchen.

Ansatz 1: 0,20 ml des zu untersuchenden Serums.
+ 0,01 ml 20 %iger Suspension von A_1-Erythrocyten.
Verdünnung: ca. 1 : 1

Ansatz 2: 0,10 ml des zu untersuchenden Serums.
+ 0,10 ml frisches AB-Serum.
+ 0,01 ml 20 %iger Suspension von A_1-Erythrocyten.
Verdünnung: ca. 1 : 2

Ansatz 3: 0,20 ml des zu untersuchenden Serums.
+ 0,01 ml 20 %iger Suspension von B-Erythrocyten.
Verdünnung: ca. 1 : 1

Ansatz 4: 0,10 ml des zu untersuchenden Serums.
+ 0,10 ml frisches AB-Serum.
+ 0,01 ml 20 %iger Suspension von B-Erythrocyten.
Verdünnung: ca. 1 : 2

Ansatz 5: 0,20 ml des zu untersuchenden Serums.
+ 0,01 ml 20 %iger Suspension von O-Erythrocyten.
Leerwert.

War bei Röhrchenansatz 2 und 4 noch eine Hämolyse zu sehen, so wurde im 2. Schritt eine Verdünnungsreihe hergestellt und die letzte Verdünnung, bei der eine Hämolyse festzustellen war als Endtiterstufe notiert.

c. Versuchsansatz bei den 209 Seren der Blutgruppe A und 59 Seren der Blutgruppe B.

Je Serum wurden 3 Ansätze benötigt:

Ansatz 1: 0,20 ml des zu untersuchenden Serums der Blutgruppe A bzw. B.
+ 0,01 ml einer 20 %igen Suspension von Erythrocyten der Blutgruppe B bzw. A_1.

Ansatz 2: 0,10 ml des zu untersuchenden Serums.
+ 0,10 ml frisches AB-Serum.
+ 0,01 ml der 20 %igen Suspension von B bzw. A_1 Erythrocyten.

Ansatz 3: Leerwert wie bei den O-Seren beschrieben.

War bei Ansatz 2 eine Hämolyse zu verzeichnen, so wurde eine Verdünnungsreihe des Serums mit AB-Serum hergestellt.

d. 2 Std. Inkubation der Coombsröhrchen bei 37° C.

e. 1 min. bei 1000 U/min. zentrifugieren.

f. Ablesen und Bewertungskriterien:

1. Vergleich der Verfärbung der überstehenden Flüssigkeiten der Röhrchen mit A_1 bzw. B-Testerythrocyten mit dem O-Röhrchen desselben Serums (Serumkontrolle).

2. Vergleich der Erythrocytensedimente zwischen Versuchsansatz und Leerkontrolle.

+++: intensive Rotfärbung beim Vergleich mit dem Leerwert; alle Erythrocyten lysiert.

++: intensive Rotfärbung; Erythrocyten nicht vollständig lysiert.

+: noch deutlich erkennbare Rotfärbung.

-: kein Unterschied beim Vergleich.

Die letzte + Verdünnungsstufe wurde als Endtiter notiert.

b) DEAE-Sephadex A-50 Gelpräparation und Batch-Verfahren:

1. Präparation des Gels:

a. 10 g trockenes DEAE-Sephadex A-50 Gel gibt man langsam unter ständigem Rühren in ein 5 l-Gefäß, das 2 l Aqua dest. enthält.
Dies sind etwa 600 ml Aqua dest. mehr, als die Menge, die WEBB (1972) zum Quellen des Gels verwendete. Es hat sich bei der Bearbeitung des Gels jedoch gezeigt, daß mit dieser Wassermenge die Gelsuspension einfacher hergestellt werden kann.

b. Ist Wasser und Gel gut vermischt, so läßt man das Gel über Nacht quellen (ca. 12 Std.).

c. Nach dieser Frist hat sich zwischen Wasser und dem

nach unten gesunkenem Gel ein gut erkennbarer Trennungsspiegel ausgebildet.
Mit einer Pasteurpipette, die über einen Plastikschlauch mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden ist, wird nun das überstehende Wasser vorsichtig abgesaugt. Dies erfolgt unter Sichtkontrolle, um zu vermeiden, daß größere Mengen an Sephadex-Gel-Kugeln mit dem destillierten Wasser aus dem Gefäß gesaugt werden.

d. Danach gibt man ca. 2,8 l 0,5 N NaOH-Lösung unter ständigem Rühren zum gequollenen Gel. Dabei tritt eine starke Schrumpfung des Gels ein. Man wartet wieder 45 min. und saugt dann den Überstand ab.

e. Mit Aqua dest. wird das Gel in 45-minütigen Intervallen nun solange gewaschen, bis es sich nicht mehr weiter ausdehnt. Dabei hat es sich bewährt, nach jedem Sedimentieren des Gels, die Höhe des Trennungsspiegels zwischen Überstand und Gel mit einem Filzstift außen am Gefäß zu markieren.
Durch dieses Waschen werden kleine Gelkugeln, die sich langsamer absetzen als die größeren, im Überstand suspendiert, mit diesem abgesaugt und so aus dem Gel entfernt.

f. Nun wird das Gel in 45-minütigen Intervallen dreimal mit je 2,8 l Sorensen-Phosphat-Puffer 0,15 M, ph 6,5 gespült.
Dabei ist wieder eine merkliche Schrumpfung zu verzeichnen.

g. Jetzt wird das Gel wieder mit je 2,8 l Aqua dest. in 45-minütigen Intervallen solange gewaschen, bis es sich nicht mehr weiter ausdehnt.
Das zum Waschen verwendete Aqua dest. ist auf ein ph von 7 eingestellt.
Bei den beiden letzten Überständen sollte man das ph messen. Wegen der Pufferkapazität des A-50 Gels sollte es nach wiederholtem Waschen mit destilliertem Wasser den ph-Wert von 6,5 halten.

2. Portionierung des Gels:

a. Etwa 80 Plastik-GPT-Röhrchen werden mit einer 5 ml-Eichmarke versehen.

b. Das überstehende Wasser wird nach dem letzten Waschen nicht vollständig, sondern so abgesaugt, daß beim Mischen von dem belassenen Überstand und dem sedimentierten Gel eine etwa 70 %ige Suspension des Gels entsteht. In dieser Verdünnung ist das Gel nicht mehr so dickflüssig und läßt sich mit einer 10 ml Pipette bequem in die Plastik-GPT-Röhrchen einfüllen.

c. Beim Abfüllen wird so verfahren, daß man die GPT-Röhrchen 1 - 1,5 cm über die 5 ml-Eichmarke mit der 70 %igen Gelsuspension füllt.

d. Läßt man die Röhrchen über Nacht stehen, so sedimentiert das Gel.
Versieht man die Röhrchen mit einem Stopfen, so können sie bei 4° C gelagert werden.
Benötigt man eine 5 ml-Gelportion, so saugt man mit der Wasserstrahlpumpe den Überstand und das Gel bis zur Eichmarke ab.
Damit erhält man pro GPT-Röhrchen exakt 5 ml 100 %iges Gel.

3. Benötigtes Material:

a. DEAE-Sephadex A-50 der Firma AB Pharmacia Uppsala, Schweden.

b. 0,5 N NaOH.

c. Herstellung des Sorensen-Puffer 0,15 M, ph 6,5.
Grundsubstanzen:
$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ Merck Nr. 6580
MG 177,9
KH_2PO_4 Merck Nr. 4873
MG 136,09

Für einen Sorensenpuffer von 6,5 benötigt man:
30 Teile $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ und

70 Teile K H_2PO_4

(Dokumenta Geigy).

Zur Herstellung von 5 l Puffer benötigt man ca. 18 g di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat und ca. 31 g Kaliumdihydrogenphosphat.
Diese Menge wird mit Aqua dest. auf 5 l aufgefüllt und gelöst.

d. Auf ph 7 eingestelltes Aqua dest.

e. Ein durchsichtiges klares 5 l Glasgefäß mit einer weiten Öffnung.

f. Ein Magnetrührer.

g. Waage.

h. ph-Meter.

i. Wasserstrahlpumpe.

k. Pasteurpipette und eine 10 ml-Glaspipette.

4. Batch-Verfahren:
a. Pro Ansatz wird 0,5 ml Schwangerenserum in ein, mit der Nummer des Serums versehenes, vorbereitetes GPT-Röhrchen zu 5 ml Sephadex A-50 Gel pipettiert.

b. Die GPT-Röhrchen werden dann mit einem Stopfen versehen.

c. Einmal von Hand kräftig schütteln, damit sich Serum und Gel gut vermischen. Danach werden die Röhrchen sofort auf einen horizontalen Blutrüttler gelegt und befestigt. Auf diesem Rüttler mit ca. 180 Aktionen pro Minute und Serum 10 min. lang gemischt.

d. Zentrifugieren: 1 Minute bei 1000 U/min.

e. Bei allen Proben wird die gleiche Menge an Überstand (2 ml) in je ein beschriftetes Plastik-GPT-

Röhrchen abpipettiert und der restliche Überstand samt Gel verworfen.

f. Isotonisieren des Überstands: Um möglichst wenig verdünnen zu müssen geht man von folgender Überlegung aus:
Werden 0,5 ml Serum mit 5 ml Aqua dest. verdünnt, so ergibt sich eine Ionenstärke, die etwa einer 0,09 %igen Kochsalzlösung entspricht.
Mit der angegebenen Formel läßt sich nun das Volumen an 8 %iger Kochsalzlösung, das man zum Isotonisieren des Überstands benötigt, berechnen:
0,09 % . 2 ml + 8 % . x ml = (2 ml + x ml) . 0,9 %.
X = 0,23 ml.

Man muß also zu jedem 2 ml-Überstand 0,23 ml 8 %ige NaCl-Lösung zugeben.
Mit diesem Verfahren ist es bei keinem Überstand zu einer Hämolyse der Testerythrocyten gekommen.

g. Herstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe bis 1 : 4 für jeden Überstand der Seren der Blutgruppe A und B: Die Titration wird unter Verwendung von Plastik-Coombsröhrchen, in physiologischer Kochsalzlösung so durchgeführt, daß pro Coombsröhrchen 0,2 ml Überstand (Titer 1 : 1) bzw. 0,2 ml dessen Verdünnung untersucht werden.
Für jeden Überstand von Seren der Blutgruppe O werden 2 Verdünnungsreihen bis 1 : 32 in 0,9 %iger NaCl-Lösung hergestellt. Eine Titerreihe zur Untersuchung des Überstands auf IgG-Anti-A- die andere zur Untersuchung der Konzentration an IgG-Anti-B-Antikörpern.

h. Testerythrocyten: Es wird eine 5 %ige Suspension von Rhesus-negativen, Kell-negativen A_1- bzw. B-Erythrocyten verwendet, die zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen wurden. Diese Erythrocyten stammten aus Spenderkonserven. In einem Vorversuch wurde mit einem gepoolten O-Serum die Agglutinabilität einer Reihe von A_1- bzw. B-Erythrocyten, die von verschiedenen

Spendern stammten geprüft. Die Konserve mit den jeweils empfindlichsten A_1- bzw. B-Erythrocyten wurde ausgewählt. Mit diesen Erythrocyten wurden sämtliche 507 Schwangerenseren (ein O-Serum mußte verworfen werden) und 27 Seren von Müttern, deren Kinder klinische Symptome der ABO-Erythroblastose hatten, untersucht.
In die Testansätze von Seren der Blutgruppe A wird je Coombsröhrchen 1 Tropfen der 5 %igen B-Erythrocytensuspension pipettiert.
Bei jenen der Blutgruppe B verwendet man die 5 %ige A_1-Erythrocytensuspension und bei der Blutgruppe O sowohl die A_1- als auch die B-Erythrocytensuspension.

i. Die Coombsröhrchen werden 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

j. Zentrifugieren: 1 min. bei 1000 U/min.

k. Sämtliche Verdünnungsreihen werden danach mikroskopisch (Vergrößerung 24 x) auf Agglutination untersucht, die auf einen Resttiter an IgM-Anti-A/B-Antikörper zurückgeführt wird. Alle Ansätze einer Verdünnungsreihe, die eine Agglutination aufweisen, werden verworfen.

Beispiel:

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
Agglutination bei Zimmertemp.	+	+	-	-	-

Die Verdünnungsstufen 1 : 1 und 1 : 2 werden verworfen, die restlichen Stufen werden auf IgG-Anti-A/B-Antikörper untersucht.
Etwa 10 % der O-Seren und 3 % der A- bzw. B-Seren zeigten bei niedrigen Verdünnungsstufen einen solchen Resttiter an IgM-Aktivität.

l. 1 Stunde Inkubation der Testansätze bei 37° C.

m. Die Testerythrocyten werden nun 3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und nach dem 3. Waschen möglichst trocken abgesaugt.

n. Zu jedem Testansatz gibt man einen Tropfen Ortho-Antihuman-Globulin, das neben Anti-IgG- auch Anti-IgM-Antikörper enthält.

o. Nachdem man die Testerythrocyten im Coombsserum durch leichtes Schütteln suspendiert hat, wird 1 min. bei 1000 U/min. zentrifugiert.

p. Mikroskopisches Ablesen bei kleinster Vergrößerung (ca. 24 x).

q. Bewertung: +: Mikroskopisch deutliche Agglutination nach dem Aufschütteln.
Die letzte + Verdünnungsstufe wurde als Endtiter notiert.
Waren sämtliche Ansätze einer Verdünnungsreihe positiv, so wurde die Titration bis zur ersten negativen Titerstufe fortgesetzt.

C. Ergebnisse

Suche nach Hämolysinen

1) 209 Seren von schwangeren Frauen der Blutgruppe A wurden auf das Vorhandensein von Hämolysinen untersucht. Bei 47,3% der Seren konnten Anti- B- Hämolysine nachgewiesen werden.
Wie sich die Endtiter der untersuchten Seren auf die einzelnen Verdünnungsstufen verteilen, ist aus Tabelle 1 und Abbildung 1 ersichtlich. Die höchste gefundene Titerstufe war 1:32. 1,4% der Seren der Blutgruppe A wiesen diese starke hämolytische Aktivität auf.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Summe
Anzahl	29	22	29	13	3	3	99
%	13,9	10,5	13,9	6,2	1,4	1,4	47,3
% kum.	47,3	33,4	22,9	9,0	2,8	1,4	47,3

Tabelle 1: Häufigkeit im positiven Ausfall des Hämolysin-Tests und Endtiterverteilung für die Anti-B-Hämolysine der Blutgruppe A.

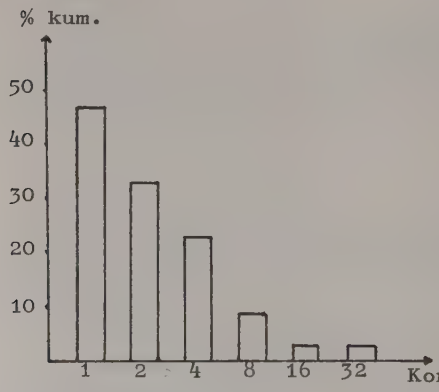


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Titerverteilung (kumuliert) für die Anti-B-Hämolysine der Blutgruppe A.

2) 59 Seren von Schwangeren der Blutgruppe B wurden gegen Erythrocyten der Blutgruppe A getestet. 55,9% führten beim Titer von 1:1 zu einer Lyse der Testerythrocyten. Die höchste Verdünnungsstufe bei der ein Serum noch eine hämolytische Aktivität zeigte war 1:8.
Tabelle 2 und Abbildung 2 zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Summe
Anzahl	6	9	16	2	-	-	33
%	10,2	15,2	27,1	3,4	-	-	55,9
% kum.	55,9	45,7	30,5	3,4	-	-	55,9

Tabelle 2: Titerverteilung für die Anti-A-Hämolysine der Blutgruppe B.

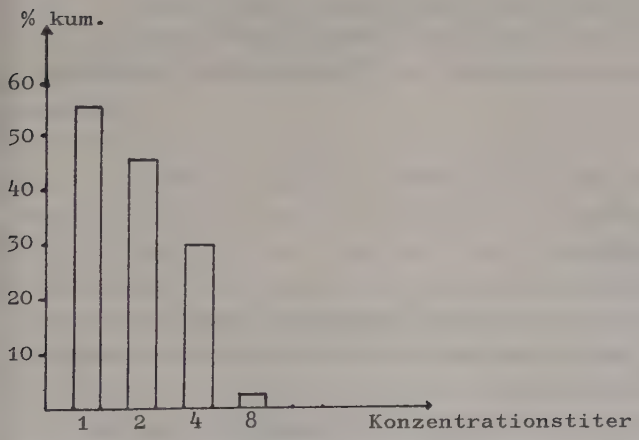


Abbildung 2: Kumulierte Darstellung der Endtiterverteilung für die Anti-A-Hämolysine der Seren der Blutgruppe B.

3) Alle 240 Seren der Blutgruppe O wurden sowohl auf Anti-A- als auch auf Anti-B-Hämolysine untersucht.

Bei 78,75% der untersuchten Seren konnte eine hämolytische Aktivität gegen A- oder B-Erythrocyten gefunden werden. 70,41% der Seren zeigten eine Hämolyse der A-Blutkörperchen, 58,3% führten zur Lyse der B-Blutkörperchen. 50% der O-Seren zerstörten sowohl die A- als auch die B-Erythrocyten.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Summe
Anzahl	66	43	29	26	4	1	169
%	27,5	17,9	12,1	10,8	1,7	0,4	70,4
% kum.	70,4	42,9	25,0	12,9	2,1	0,4	70,4

Tabelle 3a: Titerverteilung der Anti-A-Hämolysine der Seren mit der Blutgruppe O.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Summe
Anzahl	65	26	20	21	7	1	140
%	27,1	10,8	8,3	8,7	2,9	0,4	58,2
% kum.	58,2	31,1	20,3	12,0	3,3	0,4	58,2

Tabelle 3b: Titerverteilung der Anti-B-Hämolysine der Seren mit der Blutgruppe O.

Titer	1:1	1:4
Anzahl	189	79
%	78,75	32,9

Tabelle 3c: Häufigkeit mit der die Schwangerenseren der Blutgruppe O bei den Verdünnungen 1:1 und 1:4 Anti-A- oder Anti-B-Hämolysine zeigten.

Abbildung 3 stellt die Verteilung der kumulierten Endtiter für die Anti-A- und -B-Hämolysine einander gegenüber. Vergleicht man die Häufigkeiten im Auftreten von Anti-A- bzw Anti-B-Hämolysinen bei den Seren der Blutgruppe O mit dem Viefeldertest, so läßt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Hämolysingruppen aufzeigen.

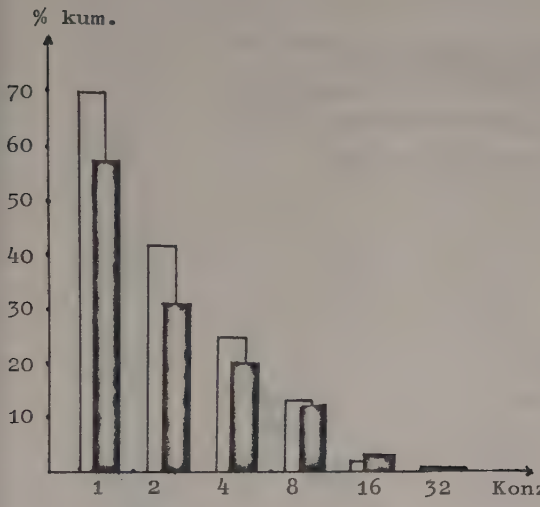


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der Endtiterverteilungen der Anti-A- und Anti-B-Hämolysine bei den Schwangeren der Blutgruppe O.

Mit hilfe der Probitanalyse erhält man, entsprechend der Darstellung auf Wahrscheinlichkeitspapier, sofern eine Normalverteilung vorliegt, für jede der untersuchten Gruppen eine Gerade.
In Abbildung 4 sind die Titerverteilungen für die Anti-A- und Anti-B-Hämolysine der O-Seren in dieser Form dargestellt. Liest man für die jeweilige Gerade den Dosiswert beim Probit 5 ab, so erhält man auf diese Weise den Logarithmus des Mediantiters für jede Gerade. Der Mediantiter ist die Verdünnung, bei der 50 % der Seren einer untersuchten Gruppe eine hämolytische Aktivität aufweisen.
Wie man aus Abbildung 4 entnehmen kann ist der Mediantiter für die Anti-A-Hämolysine im Vergleich zu den Anti-B-Hämolysinen gegen eine kleinere Dosis d.h. eine höhere Verdünnungsstufe verschoben. Das Sensibilisierungsniveau liegt bei den Anti-A- also etwas höher als bei den Anti-B-Hämolysinen. Der Unterschied ist jedoch nicht groß, da beide Geraden annähernd den gleichen Verlauf aufweisen.

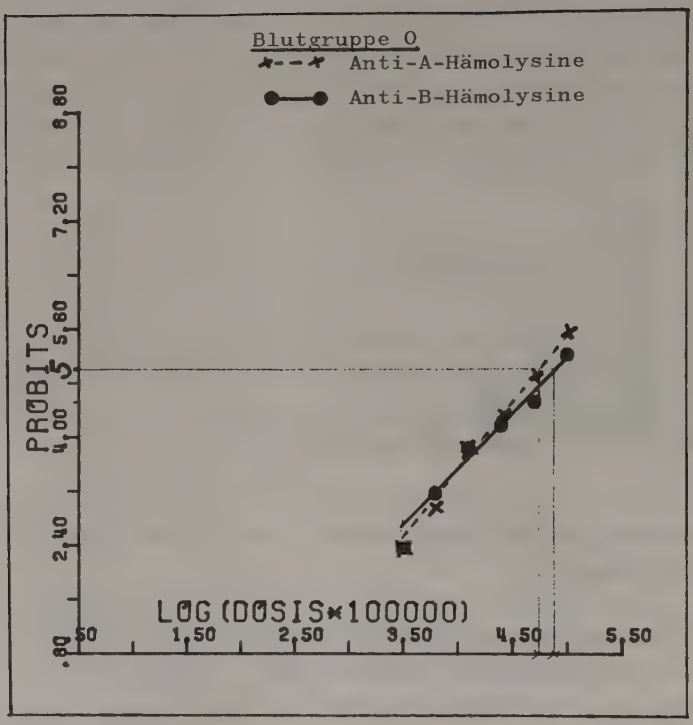


Abbildung 4: Probitgeraden für die Endtiterverteilungen der Anti-A- und Anti-B-Hämolysine bei den Schwangerenseren der Blutgruppe O.

In Abbildung 5 sind die Probitgeraden der Anti-A-Hämolysine für die Seren der Blutgruppen A und O vergleichend dargestellt.
Führt man beim Titer von 1:1 den Vierfeldertest durch, so erhält man einen signifikanten Unterschied (p=0,05). Bei den Seren der Blutgruppe O signifikant häufiger Anti-A-Hämolysine auf als bei jenen der Blutgruppe B.
Durch den Vergleich der beiden Probitgeraden wird aber deutlich, daß die Geraden bis zu einer Verdünnung von 1:8 fast identisch sind. Beide Verteilungen besitzen also annähernd den gleichen Mediantiter. Die Gerade für die Seren der Blutgruppe O setzt sich jedoch bis zum Titer 1:32 fort.

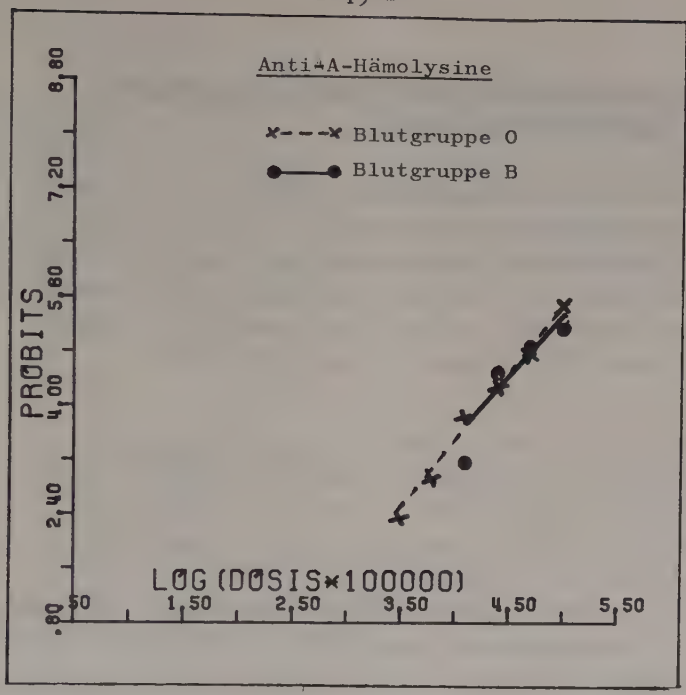


Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der Probitgeraden für die Anti-A-Hämolysine bei den Seren der Blutgruppen B und O.

Die Probitgeraden für die Anti-B-Hämolysine bei den Seren der Blutgruppen A und O sind über den gesamten Kurvenverlauf annähernd identisch. Führt man beim Titer von 1:1 den Vierfeldertest durch, so findet man, daß die Seren der Blutgruppe O nicht signifikant häufiger Anti-B-Hämolysine aufweisen, als die Seren der Blutgruppe A.
78,7 % der O-Seren zeigten Anti-A- oder -B-Hämolysine. Setzt man diesen Wert in den Vierfeldertest ein, so haben die Seren der Blutgruppe O hochsignifikant mehr Hämolysine als die Blutgruppen A oder B. ($p=0,01$).

Nachweis von IgG-Anti-A/B-Antikörpern mit dem DEAE-Sephadex A-50 -Batch-Verfahren.

1) Bei 209 Seren von Schwangeren der Blutgruppe A wurde nach IgG-Anti-B-Antikörpern gesucht.
Tabelle 4 zeigt die Verteilung der Endtiter. 12,1 % der Seren ergaben bei der kleinsten Verdünnungsstufe einen positiven Coombstest. Bei den restlichen 87,9 % konnten keine IgG-Anti-B-Antikörper nachgewiesen werden.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Summe
Anzahl	6	12	4	2	-	1	25
%	2,9	5,7	2	1	-	0,5	12,1
% kum.	12,1	9,2	3,5	1,5	0,5	0,5	12,1

Tabelle 4: Verteilung der IgG-Anti-B-Antikörper bei den Seren der Blutgruppe A.

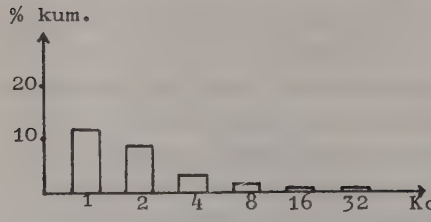


Abbildung 6: Darstellung der kumulierten Verteilung der Titerendstufen für die IgG-Anti-B-Antikörper der Blutgruppe A.

2) Bei den 59 Seren der Blutgruppe B konnten in 6,8 % der Fälle IgG-Anti-A-Antikörper nachgewiesen werden.
Die Endtiterverteilung ist aus Tabelle 5 ersichtlich.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Summe
Anzahl	-	2	1	1	-	-	4
%	-	3,4	1,7	1,7	-	-	6,8
% kum.	6,8	6,8	3,4	1,7	-	-	6,8

Tabelle 5: Verteilung der Endtiter für die IgG-Anti-A-Antikörper bei der Blutgruppe B.

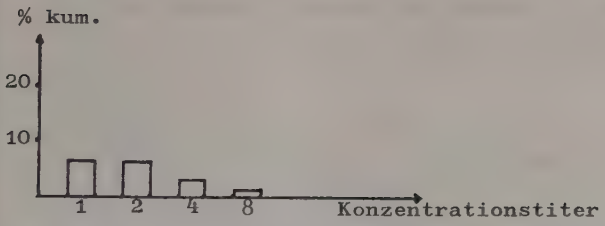


Abbildung 7: Darstellung der kumulierten Endtiterverteilung für die IgG-Anti-A-Antikörper bei den Seren der Blutgruppe B.

3) Von den 240 Seren der Blutgruppe O mußte eines verworfen werden, weil das Volumen zur Durchführung des Tests zu gering war.
Sämtliche 239 Seren wurden auf IgG-Anti-A/B-Antikörper untersucht. Aus Tabelle 6a ist ersichtlich, daß bei 93,2 % IgG-Anti-A-Antikörper nachgewiesen werden konnten.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	9	21	35	40	46	26	28	11
%	3,8	8,8	14,6	16,7	19,2	10,9	11,7	4,6
% kum.	93,2	89,4	80,6	66,0	49,3	30,1	19,2	7,5

Fortsetzung: nächste Seite

1:256	1:512	1:1024	Summe
5	1	1	223
2,1	0,4	0,4	93,2
2,9	0,8	0,4	93,2

Tabelle 6a: Verteilung der IgG-Anti-A-Endtiter bei den Seren der Blutgruppe O.

85,2 % der Seren von Schwangeren der Blutgruppe O hatten IgG-Anti-B-Antikörper in so hoher Konzentration im Serum, daß sie mit dem verwendeten Verfahren nachgewiesen werden konnten. Nur 3,8 % (9 Seren) der O-Seren zeigten weder IgG-Anti-A- noch IgG-Anti-B-Antikörper.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	17	38	32	45	35	18	10	7
%	7,1	15,9	13,4	18,8	14,6	7,5	4,2	2,9
% kum.	85,2	78,1	62,2	48,8	30,0	15,4	7,9	3,7

1:256	1:512	1:1024	Summe
2	-	-	204
0,8	-	-	85,2
0,8	-	-	85,2

Tabelle 6b: Verteilung der IgG-Anti-B-Endtiter bei den Seren der Blutgruppe O.

Abbildung 8 zeigt in vergleichender Darstellung die Endtiterverteilungen der IgG-Anti-A- und -Anti-B-Antikörper.

Abbildung 9 stellt die Titerverteilungen der IgG-Anti-A/B-Antikörper für die Blutgruppen A, B und O in Form ihrer Probitgeraden vergleichend dar. Bei der Blutgruppe O ist die Gerade der IgG-Anti-A- gegenüber der Gerade für die IgG-Anti-B-Antikörper um etwa eine Titerstufe nach links verschoben. Beide Geraden für die Schwangerenseren der Blutgruppe O zeigen gegenüber denen der Blutgruppen A und B

eine erhebliche Linksverschiebung. Das Sensibilisierungsniveau der O-Schwangeren ist also wesentlich höher als jenes, das man bei schwangeren Frauen der Blutgruppen A oder B antrifft.
Bei Schwangeren der Blutgruppe O findet man hochsignifikant (p=0,01) häufiger IgG-Anti-A/B-Antikörper als bei Seren der Blutgruppen A oder B.

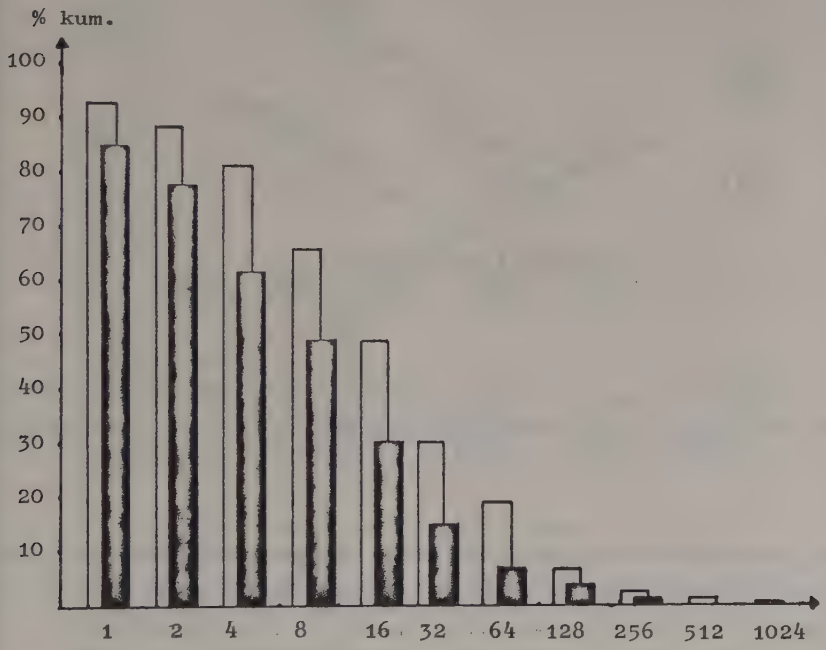


Abbildung 8: Endtiterverteilung der IgG-Anti-A- und -Anti-B-Antikörper bei den Schwangerenseren der Blutgruppe O.

4) Um den Einfluß des Alters der Schwangeren auf die Antikörperbildung zu untersuchen, wurden die O-Seren in zwei Gruppen aufgeteilt.
Abbildung 10 zeigt in vergleichender Darstellung die Probitgeraden für die IgG-Anti-A-Antikörper. Man kann daraus entnehmen, daß die Altersgruppe bis zum 25. Lebensjahr, ent-

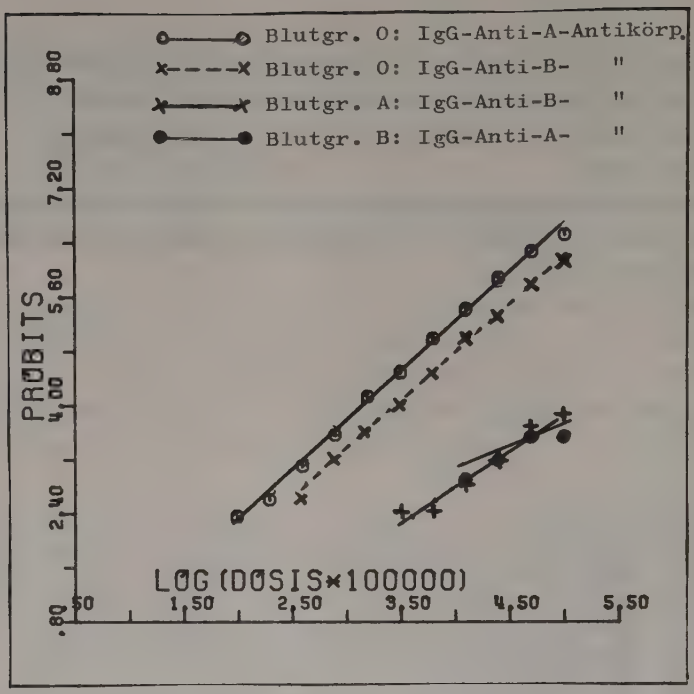


Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der Probitgeraden für die IgG-Anti-A/B-Antikörper bei den Seren der Blutgruppen A, B und O.

gegen der Erwartung ein etwas höheres Sensibilisierungsniveau aufweist als die Gruppe der über 25 jährigen Schwangeren. Die Steigung der Geraden für die jüngeren Frauen ist größer als bei der Vergleichsgruppe, d.h. die Verteilung der IgG-Anti-A-Antikörper bei den jüngeren Schwangeren weist eine geringere Streuung des Mediantiters auf.

Abbildung 11 zeigt die Probitgeraden für die IgG-Anti-B-Antikörper bei diesen Altersgruppen. Beide Geraden verlaufen annähernd parallel, die Streuung beider Verteilungen ist also fast gleich. Bei den IgG-Anti-B-Antikörpern haben die Schwangeren höheren Alters eine größere Sensibilisierung als die jüngeren. Vergleicht man die beiden Gruppen

beim gemeinsamen Mediantiter im Vierfeldertest, so ergibt sich weder für die IgG-Anti-A-, noch für die IgG-Anti-B-Antikörper ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

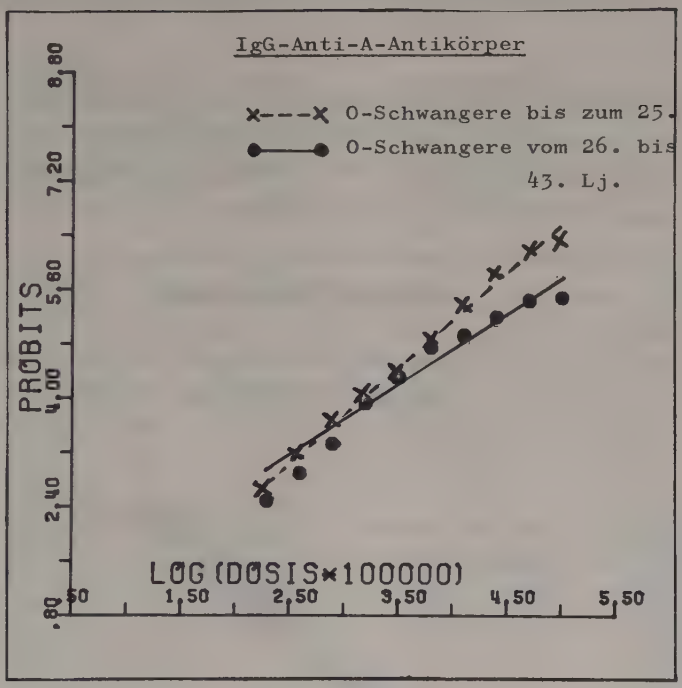


Abbildung 10: Probitgeraden für die IgG-Anti-A-Antikörper bei den O-Schwangeren bis zum 25. und jenen vom 26. bis 43. Lebensjahr.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	3	9	17	26	19	9	10	6
%	2,6	8,0	15,0	23,0	16,8	8,0	8,8	5,3
% kum.	91,2	88,4	80,4	65,4	42,4	25,6	17,6	8,8

1:256	1:512	1:1024	Summe
3	1	-	103
2,6	0,9	-	91,2
3,5	0,9	-	91,2

Tabelle 7a: Verteilung der IgG-Anti-A-Antikörper bei 113 O-Schwangeren im Alter bis zu 25 Jahren.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	10	21	14	21	13	5	5	3
%	8,8	18,6	12,4	18,6	11,5	4,4	4,4	2,6
% kum.	82,2	73,4	54,8	42,4	23,8	12,3	7,9	3,5

1:256	1:512	1:1024	Summe
1	-	-	93
0,9	-	-	82,2
0,9	-	-	82,2

Tabelle 7b: Verteilung der IgG-Anti-B-Antikörper bei 113 O-Schwangeren im Alter bis zu 25 Jahren.

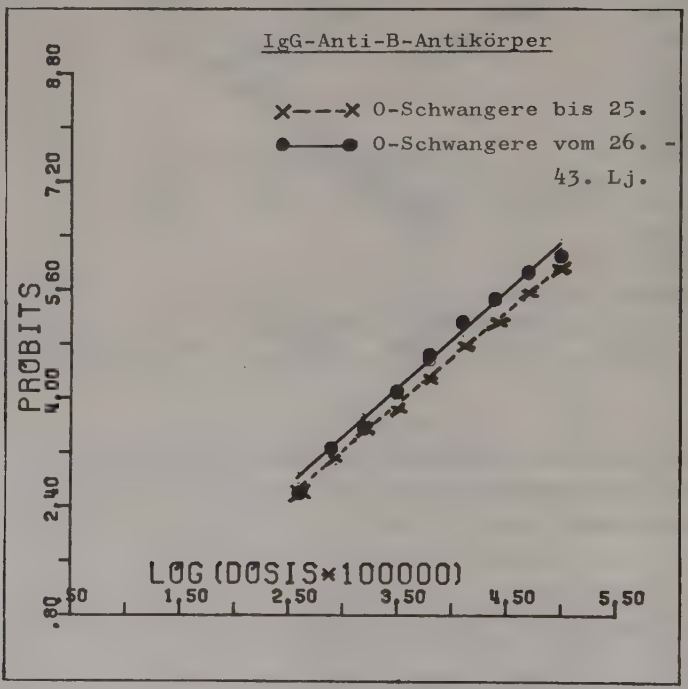


Abbildung 11: Probitgeraden für die IgG-Anti-B-Antikörper bei den O-Schwangeren bis zum 25. und jenen vom 26. bis 43. Lebensjahr.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	3	15	18	12	26	18	16	5
%	2,5	12,4	14,9	9,9	21,5	14,9	13,2	4,1
% kum.	95,8	93,3	80,9	66,0	56,1	34,6	19,7	6,5

1:256	1:512	1:1024	Summe
2	-	1	116
1,6	-	0,8	95,8
2,4	0,8	0,8	95,8

Tabelle 8a: Verteilung der IgG-Anti-A-Antikörper bei 121 O-Schwangeren im Alter von 26 bis 43 Jahren.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	7	15	16	23	22	13	4	4
%	5,8	12,4	13,2	19,0	18,2	10,7	3,3	3,3
% kum.	86,7	80,9	68,5	55,3	36,3	18,1	7,4	4,1

1:256	1:512	1:1024	Summe
1	-	-	105
0,8	-	-	86,7
0,8	-	-	86,7

Tabelle 8b: Verteilung der IgG-Anti-B-Antikörper bei 121 O-Schangeren im Alter von 26 bis 43 Jahren.

5) Da nicht bei allen Schwangeren in Erfahrung gebracht werden konnte, ob es sich um erst- oder mehrgebährende Frauen handelte, konnten nur 100 Seren der Blutgruppe O unter diesem Aspekt ausgewertet werden.
Abbildung 12 zeigt die Probitgeraden für die IgG-Anti-A- und Abbildung 13 für die IgG-Anti-B-Antikörper bei Erst- und Mehrgebährenden in vergleichender Darstellung.
Aus diesen Abbildungen ist ersichtlich, daß weder bei den IgG-Anti-A- noch bei den IgG-Anti-B-Antikörpern ein wesentlicher Unterschied im Sensibilisierungsniveau zwischen diesen beiden Gruppen zu verzeichnen ist. Führt man am für jeweils zwei verglichene Verteilungen, gemeinsamen Mediantiter

(siehe Statistik) den Vierfeldertest durch, so läßt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Erst- und Mehrgebährenden aufzeigen.

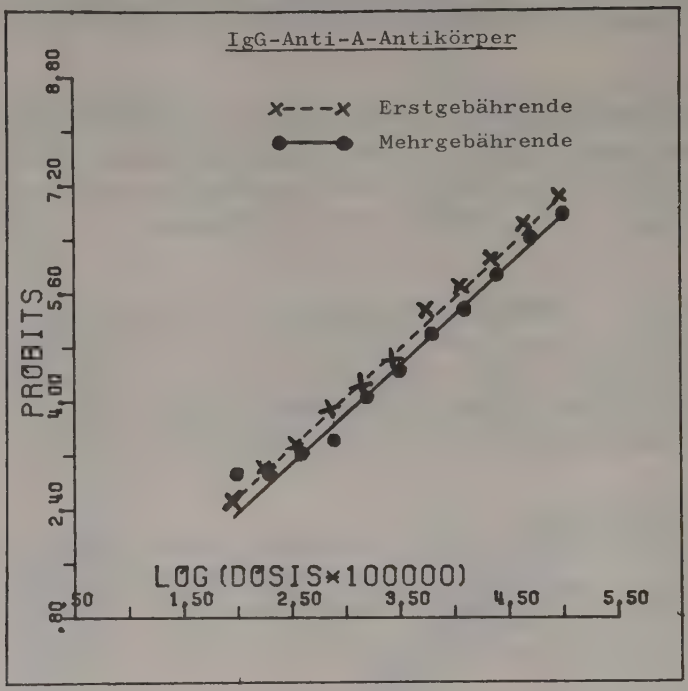


Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der Probitgeraden für die IgG-Anti-A-Antikörper bei Erst- und bei Mehrgebährenden.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	1	7	5	5	13	5	5	2
%	2,1	14,6	10,4	10,4	27,1	10,4	10,4	4,2
% kum.	97,9	95,8	81,2	70,8	60,4	33,3	22,9	12,5

1:256	1:512	1:1024	Summe
3	1	-	47
6,2	2,1	-	97,9
8,3	2,1	-	97,9

Tabelle 9a:
Verteilung der IgG-Anti-A-Antikörper bei 48 erstgebährenden Frauen.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	3	9	6	6	9	5	3	1
%	6,2	18,7	12,5	12,5	18,7	10,4	6,2	2,1
% kum.	87,3	81,1	62,4	49,9	37,4	18,7	8,3	2,1

1:256	1:512	1:1024	Summe
-	-	-	42
-	-	-	87,3
-	-	-	87,3

Tabelle 9b: Verteilung der IgG-Anti-B-Antikörper bei 48 erstgebährenden Frauen.

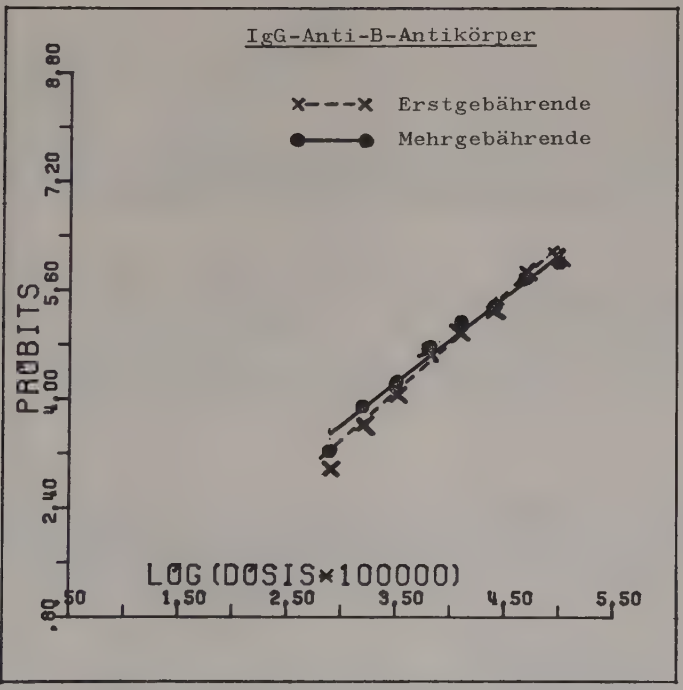


Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der Probitgeraden für die IgG-Anti-B-Antikörper bei Erst- und bei Mehrgebährenden.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	2	6	9	7	11	6	6	1
%	3,8	11,6	17,3	13,5	21,1	11,6	11,6	1,9
% kum.	96,2	92,4	80,8	63,5	50,0	28,9	17,3	5,7

1:256	1:512	1:1024	Summe
1	-	1	50
1,9	-	1,9	96,2
3,8	1,9	1,9	96,2

Tabelle 10a:
Endtitervèrteilung der IgG-Anti-A-Antikörper bei 52 mehrgebährenden Frauen.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	3	8	4	8	10	4	5	2
%	5,8	15,4	7,7	15,4	19,2	7,7	9,6	3,8
% kum.	84,6	78,8	63,4	55,7	40,3	21,1	13,4	3,8

1:256	1:512	1:1024	Summe
-	-	-	44
-	-	-	84,6
-	-	-	84,6

Tabelle 10b:
Endtiterverteilung der IgG-Anti-B-Antikörper bei 52 mehrgebährenden Frauen.

6) 158 Seren der Blutgruppe O wurden unter dem Gesichtspunkt der Schwangerschaftsdauer in zwei Gruppen geteilt. Die eine umfaßt 94 Seren von Schwangerschaften bis zur 19. Woche, die andere 64 Seren aus der Zeit zwischen der 20. und 40. Schwangerschaftswoche.
Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11a,b und 12a,b zusammengefaßt.
Abbidung 14 für die IgG-Anti-A- und Abbildung 15 für die IgG-Anti-B-Antikörper zeigen den Vergleich der Probitgeraden dieser beiden Gruppen.

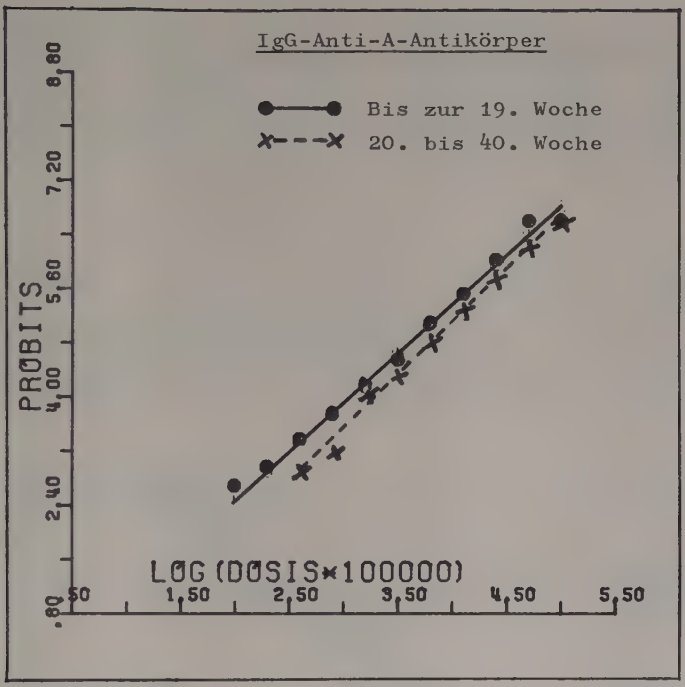


Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der Probitgeraden für die IgG-Anti-A-Antikörper bei Seren, die aus der ersten Hälfte der Schwangerschaft und bei Seren, die aus der zweiten Hälfte der Schwangerschaft stammten.

Führt man für die in den Abbildungen 14 und 15 dargestellten Paare bei dem jeweiligen geschätzten gemeinsamen Mediantiter den Vierfeldertest durch, so findet man keinen signifikanten Unterschied im Sensibilisierungsniveau.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	-	9	14	15	20	12	9	5
%	-	9,6	14,9	15,9	21,3	12,8	9,6	5,3
% kum.	94,7	94,7	85,1	70,2	54,3	33,1	20,3	10,7

1:256	1:512	1:1024	Summe
3	1	1	89
3,2	1,1	1,1	94,7
5,4	2,2	1,1	94,7

Tabelle 11a: Endtiterverteilung für 94 O-Seren, die bis zur 19. Schwangerschaftswoche abgenommen wurden (IgG-Anti-A-Antikörper).

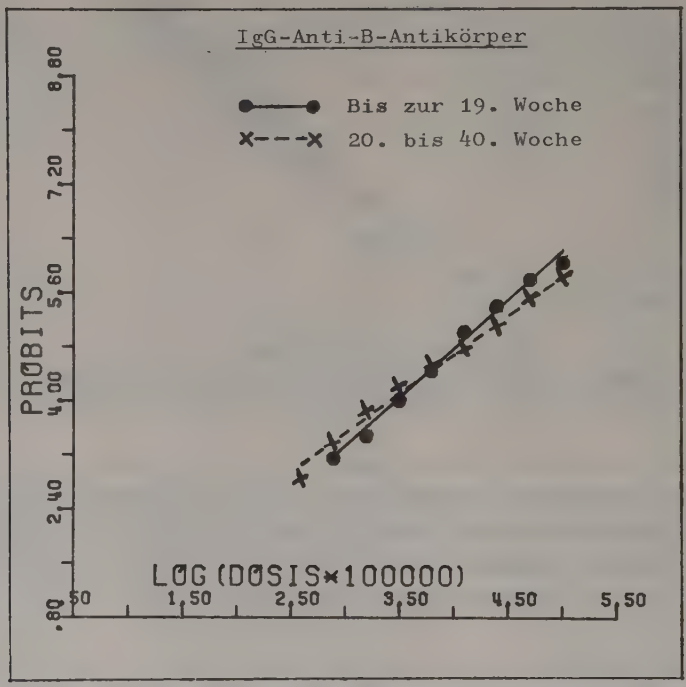


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der Probitgeraden für die IgG-Anti-B-Antikörpertiter von Seren, die aus der ersten und solchen, die aus der zweiten Hälfte der Schwangerschaft stammten.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	6	12	14	21	12	9	3	3
%	6,4	12,8	14,9	22,3	12,8	9,6	3,2	3,2
% kum.	85,2	78,8	66,0	51,1	28,8	16,0	6,4	3,2

1:256	1:512	1:1024	Summe
-	-	-	80
-	-	-	85,2
-	-	-	85,2

Tabelle 11b: Endtiterverteilung für 94 O-Seren, die bis zur 19. Schwangerschaftswoche abgenommen wurden (IgG-Anti-B-Antikörper).

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	3	8	10	13	11	4	9	1
%	4,7	12,5	15,6	20,3	17,2	6,2	14,1	1,6
% kum.	93,8	89,1	76,6	61,0	40,7	23,5	17,3	3,2

1:256	1:512	1:1024	Summe
1	-	-	60
1,6	-	-	93,8
1,6	-	-	93,8

Tabelle 12a: Endtiterverteilung der IgG-Anti-A-Antikörper für 64 O-Seren, die zwischen der 20. und 40. Schwangerschaftswoche abgenommen wurden.

Titer	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	6	11	8	6	7	5	5	2
%	9,4	17,2	12,5	9,4	10,9	7,8	7,8	3,1
% kum.	79,7	70,3	53,1	40,6	31,2	20,2	12,5	4,7

1:256	1:512	1:1024	Summe
1	-	-	51
1,6	-	-	79,7
1,6	-	-	79,7

Tabelle 12b: Endtiterverteilung der IgG-Anti-B-Antikörper für 64 O-Seren, die zwischen der 20. und 40. Schwangerschaftswoche abgenommen wurden.

7) Zusammenhang zwischen IgG-Anti-A- und IgG-Anti-B-Antikörpertitern.

Die O-Seren wurden in 4 Gruppen geteilt, wie es aus Tabelle 13 zu ersehen ist.

Titer > 1:16 IgG-Anti-A- und -Anti-B Antikörper	Titer > 1:16 IgG-Anti-A- oder -B- Antikörper	Titer ≤ 1:16 IgG-Anti-A- und -Anti-B- Antikörper	Titer ≤ 1:16 IgG-Anti-A- oder -B- Antikörper	Summe
87	3	107	34	231
36,4 %	1,3 %	44,8 %	14,2 %	96,7 %

Tabelle 13: Aufteilung der 239 untersuchten O-Schwangerenseren auf die angegebenen Gruppen.

Führt man mit diesen Ergebnissen den Vierfeldertest durch, so erhält man einen Wert von 5,8. Seren, deren IgG-Anti-A- und/oder -Anti-B-Antikörpertiter > 1:16 ist, haben signifikant (p=0,05) häufiger IgG-Anti-A- und -Anti-B-Antikörper als jene Seren, deren IgG-Anti-A/B-Antikörpertiter ≤ 1:16 ist.

8) Es soll nun die Frage beantwortet werden, ob hohe IgG-Anti-A/B-Titer an das Auftreten von Hämolysinen geknüpft sind.
Tabelle 14 und Abbldung 16 zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung.

IgG-Anti-A-Titer	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	21	35	40	46	26	28	11
Seren mit Anti-A-Hämolysinen	10	22	29	36	19	27	11
%	47,6	62,9	72,5	78,2	73,1	96,4	100

1:256	1:512
5	1
5	1
100	100

Tabelle 14a: Anteil der Seren, bei denen mit ansteigendem IgG-Anti-A-Titer Anti-A-Hämolysine nachzuweisen waren. Die Ergebnisse wurden an den O-Schwangerenseren gewonnen.

IgG-Anti-B-Titer	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Anzahl	38	32	45	35	18	10	7
Seren mit Anti-B-Hämolysinen	19	16	23	24	16	10	7
%	50,0	50,0	51,0	68,6	88,9	100	100

1:256	1:512
2	-
2	-
100	-

Tabelle 14b: Anteil der O-Seren, bei denen mit ansteigendem IgG-Anti-B-Titer Anti-B-Hämolysine nachzuweisen waren.

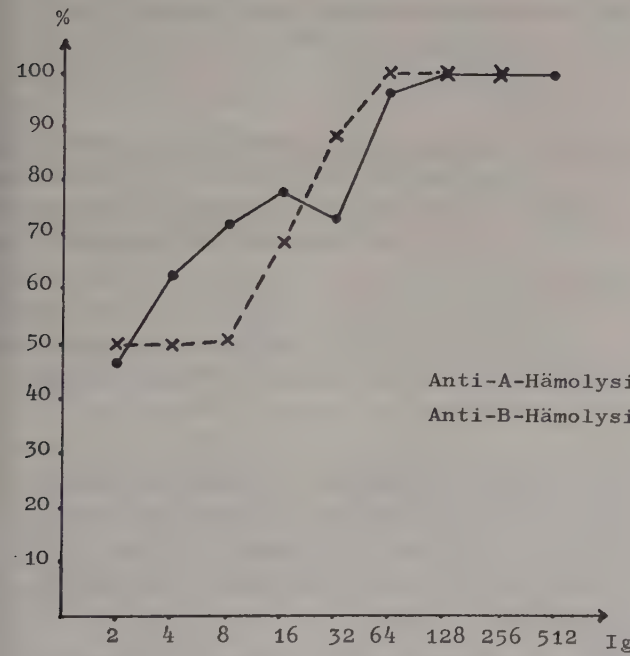


Abbildung 16: Anstieg im Auftreten der Anti-A/B-Hämolysine in Abhängigkeit von der Konzentration der IgG-Anti-A/B-Antikörper.

Der Anstieg der Anti-A-Hämolysine mit zunehmenden IgG-Anti-A-

Antikörperkonzentrationen erfolgt früher als bei den Anti-B-Hämolysinen, er ist jedoch nicht so steil. Ab einem IgG-Endtiter von etwa 1:64 treten bei sämtlichen Seren Hämolysine auf.

9) Es soll nun geprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem kombinierten Auftreten von Anti-A- und -B-Hämolysinen gibt. Die Seren der Blutgruppe O wurden unter diesem Aspekt in drei Gruppen geteilt.
Ergebnis: Treten Anti-A- und -B-Hämolysine in den Seren auf, so finden sich hochsignifikant (p=0,01) mehr IgG-Anti-A/B-Titer $\geqq$ 1:16 als bei Seren, die nur Anti-A- oder -B-Hämolysine aufweisen. Seren, bei denen Anti-A- oder -B-Hämolysine nachweisbar sind, haben signifikant (p=0,05) mehr IgG-Anti-A/B-Antikörper mit Titern $\geqq$ 1:16 als Seren ohne hämolytische Aktivität.

	IgG-Anti-A/B $\geqq$ 1:16	IgG-Anti-A/B < 1:16
Seren mit Anti-A- und -B-Hämolysinen	85	35
Seren mit Anti-A- oder -B-Hämolysinen	33	35
Seren ohne Anti-A/B-Hämolysine	13	38

Tabelle 15: Einteilung der O-Schwangerenseren in die drei genannten Gruppen unter dem Aspekt des IgG-Anti-A/B-Titers.

Vergleicht man die Seren mit Anti-A- und -B-Hämolysinen mit denen, die nur Anti-A- oder -B-Hämolysine hatten im Vierfeldertest, so erhält man das Prüfmaß 8,3. Beim Vergleich der Seren, die Anti-A- oder -B-Hämolysine mit denen ohne hämolytische Aktivität erhält man den Wert 5,6.

10) Vergleich der Antikörperkonzentrationen bei Schwangeren mit denen bei einem Kollektiv nicht schwangerer Frauen . Dazu wurden die Ergebnisse einer Arbeit übernommen, bei der man mit den gleichen Methoden nach Hämolysinen und IgG-Anti-

A/B-Antikörper suchte. Zu diesem Vergleich sollen die Ergebnisse für die Seren von nichtschwangeren Spenderinnen herangezogen werden.

Blutgruppe A	3 (12,1) % IgG-Anti-B-Antikörper
Blutgruppe B	5,8 (6,8) % IgG-Anti-A-Antikörper
Blutgruppe O	85,0 (93,2) % IgG-Anti-A-Antikörper
Blutgruppe O	71,7 (85,2) % IgG-Anti-B-Antikörper

Tabelle 16: Gegenüberstellung der Ergebnisse bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schwangeren.

Vergleich mit dem Vierfeldertest beim Titer 1:1	Prüfmaß
Blutgruppe A Schwangere und Blutgruppe A Spenderinnen	4,7
Blutgruppe B Schwangere und Blutgruppe B Spenderinnen	0
Blutgruppe O (-Anti-A-) Schw. und Spend.	2,7
Blutgruppe O (-Anti-B-) Schw. und Spend.	4,6

Tabelle 17: Vergleich der Ergebnisse für die IgG-Anti-A/B-Antikörper bei Spenderinnen und Schwangeren mit dem Vierfeldertest (X^2- Test).

Führt man den Vierfeldertest bei der Titerstufe 1:1 durch, so stellt man fest, daß bei schwangeren Frauen der Blutgruppe A signifikant (p=0,05) häufiger IgG-Anti-B-Antikörper gefunden werden als bei nicht schwangeren Frauen. Bei der Blutgruppe B gibt es keinen Unterschied. Betrachtet man die Seren der Blutgruppe O, so bleibt der Wert bei den IgG-Anti-A-Antikörpern unter dem Signifikanzniveau, während die Seren der Schwangeren ein signifikant häufigeres Auftreten von IgG-Anti-B-Antikörpern erkennen lassen. Um dem Kurvenverlauf bei beiden Gruppen Rechnung zu tragen, wurde für die O-Seren der Mediantiter geschätzt und bei dieser Verdünnungsstufe

der Vierfeldertest durchgeführt.
Der geschätzte gemeinsame Mediantiter für die IgG-Anti-A-Antikörper bei beiden Gruppen beträgt 1:8, für die IgG-Anti-B-Antikörper 1:4. Der Vierfeldertest ergibt bei diesen Verdünnungen in beiden Fällen den Wert 5,7.
Seren von Schwangeren weisen also signifikant (p=0,05) mehr IgG-Anti-A-Titer $\geq$ 1:8 und signifikant mehr IgG-Anti-B-Titer $\geq$ 1:4 auf als die Seren von nicht schwangeren Frauen.

		Prüfmaß
Blutgruppe A	25,6 (47,3) % Anti-B-Hämolysine	9,2
Blutgruppe B	41,5 (55,9) % Anti-A-Hämolysine	3,6
Blutgruppe 0	59,5 (70,4) % Anti-A-Hämolysine	2,1
Blutgruppe 0	30,0 (58,2) % Anti-B-Hämolysine	15,0

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse des Hämolysintests bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen und deren Vergleich im Vierfeldertest.

Die Seren von Schwangeren weisen bei den Blutgruppen A, B und 0 mehr Hämolysine auf als die Seren der Spenderinnen. Außer bei den Anti-A-Hämolysinen der Blutgruppe 0, ist dieser Unterschied signifikant.

Abbildung 17 zeigt in vergleichender Darstellung die Probitgeraden für die IgG-Anti-A/B-Antikörper bei schwangeren und bei nicht schwangeren Frauen. Man kann daraus die Parallelverschiebung der Geraden für die Schwangerenseren gegen höhere Titerstufen im Vergleich zu den Geraden für die IgG-Anti-A/B-Antikörper bei nicht schwangeren Frauen ersehen.
Durch die Schwangerschaft ist es also zu einer Anhebung des Sensibilisierungsniveaus über die Grundimmunisierung, wie man sie bei nicht schwangeren Frauen nachweisen kann, gekommen.

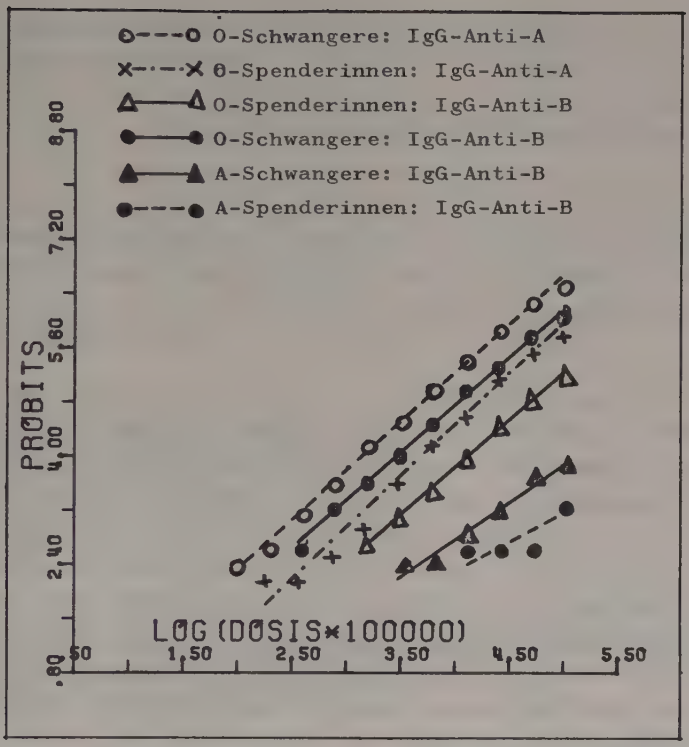


Abbildung 17: Probitgeraden für die IgG-Anti-A/B-Antikörper bei Schwangeren und bei nicht schwangeren Spenderinnen.

11) Verwendung von monospezifischem Anti-IgG- bzw. -IgM-Serum.

Die Batch-Überstände von 4 Seren, bei denen mit dem verwendeten Verfahren IgG-Anti-A/B-Antikörper nachgewiesen werden konnten, wurden nochmals auf diese Antikörper untersucht. Dabei wurde durch Paralleltitration die Möglichkeit geschaffen mit monospezifischem Anti-IgG- und Anti-IgM-Serum den Coombstest getrennt durchzuführen. Die monospezifischen Seren stammten von den BehringwWerken A.G., Marburg/L.. Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

Serum der Blutgruppe	Titer mit Ortho-Serum	Titer unter Verwendung von monospezifischem	
		Anti-IgG	Anti-IgM
A	1:4	1:8	-
A	1:4	1:8	-
B	1:8	1:8	-
0	1:8	1:8	-

Tabelle 19: Untersuchung von 4 Seren mit polyvalentem Ortho-Antihumanglobulin und monospezifischen Seren.

Bei allen 4 Seren fiel der Coombstest bei Verwendung des monospezifischen Anti-IgM-Serums negativ aus, während mit dem Anti-IgG-Serum die ersten 4 Verdünnungsstufen beim Coombstest ein positives Resultat lieferten. Unter Verwendung von DEAE-Sephadex A-50 ist es also möglich eine scharfe Trennung von IgM- und IgG-Anti-A/B-Antikörpern durchzuführen. Findet man bei der Negativkontrolle, d.h. nach der Inkubation des Batch-Überstandes bei Zimmertemperatur, keine Agglutination, so werden mit Ortho-Antihumanglobulin, das neben dem Anti-IgG- auch einen Anti-IgM-Anteil enthält, ausschließlich IgG-Anti-A/B-Antikörper nachgewiesen.

12) 27 Seren von Müttern, deren Neugeborene klinisch den Verdacht erweckten an einer ABO-Erythroblastose erkrankt zu sein, wurden mit dem Batch-Verfahren bearbeitet.
Die Ergebnisse sind in den Tabellen 20a,b,c aufgeführt.

Titer	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
Anzahl	1	1	2	6	5	7	4	-
%	3,7	3,7	7,4	22,2	18,5	25,9	14,8	-
% kum.	100	96,3	92,6	85,2	62,9	44,4	18,5	3,7

4096	8192	16384	Summe
-	-	1	27
-	-	3,7	100
3,7	3,7	3,7	100

Tabelle 20a: Inkompatible IgG-Anti-A/B-Titer bei den 27 untersuchten Seren.

Bei 20 der 27 Seren lag eine O-A- und bei 6 Seren eine O-B-Mutter-Kind-Kombination vor. In einem Fall, mit dem Endtiter 1:16, hatte die Mutter die Blutgruppe A und das Kind die Blutgruppe AB. Bei allen 27 Seren fanden sich Hämolysine.

Titer	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
Anzahl	-	1	1	4	3	6	4	-
%	-	5	5	20	15	30	20	-
% kum.	100	100	95	90	70	55	25	5

4096	8192	16384	Summe
-	-	1	20
-	-	5	100
5	5	5	100

Tabelle 20b: Endtitervertei-lung der 20 Seren mit einer O-A-Unverträglichkeit.

Von den 20 Fällen mit einer O-A-Unverträglichkeit wurden 9 und von den 6 Fällen mit einer O-B-Unverträglichkeit wurde 1 Kind einer Austauschtransfusion unterzogen.

Titer	1:128	1:256	1:512	1024	2048	4096	8192	16384	Summe
Anzahl	1	2	4	2	-	-	-	1	10
%	3,7	7,4	14,8	7,4	-	-	-	3,7	37,0
% kum.	37,0	33,3	25,9	11,1	3,7	3,7	3,7	3,7	37,0

Tabelle 20c: Inkompatible IgG-Anti-A/B-Titer im mütterlichen Serum bei 10 Fällen, wo das Kind eine Austauschtransfusion bekommen mußte. Die Prozentwerte beziehen sich auf die gesammten 27 Seren.

Abbildung 18 zeigt die kumulierten Endtiter für die IgG-Anti-A-Antikörper bei den 239 O-Schwangerenseren und bei den 20 Fällen mit einer O-A-Unverträglichkeit.

Abbildung 19 stellt diese beiden Gruppen als Probitgeraden dar. Zusätzlich ist die Gerade für die 10 Fälle, bei denen eine Austauschtransfusion nötig war, eingezeichnet.

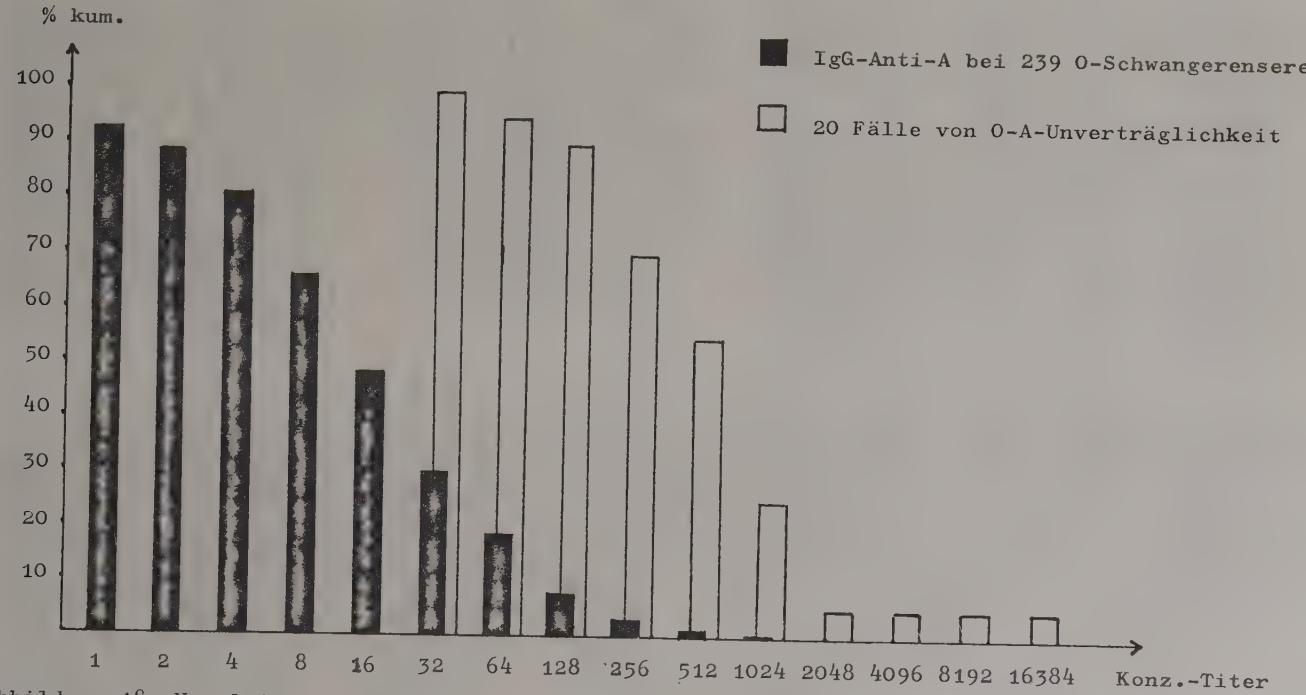


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der kumulierten Endtiter der IgG-Anti-A-Antikörper bei 239 O-Schwangerenseren und bei 20 Fällen von O-A-Unverträglichkeit.

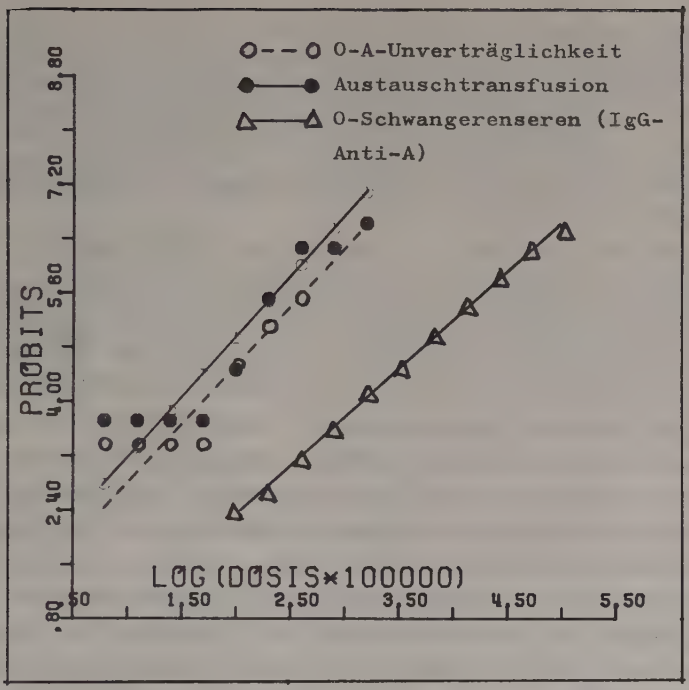


Abbildung 19: Probitgeraden für die IgG-Anti-A-Endtiter bei 239 O-Schwangeren und bei 20 Fällen von O-A-Unverträglichkeit. Zusätzlich ist die Probitgerade für die IgG-Anti-A/B-Titer bei 10 Fällen, wo eine Austauschtransfusion nötig war, eingezeichnet.

Aus Abbildung 18 kann man entnehmen, daß es zwischen dem Normalkollektiv der O-Schwangeren und den Müttern, deren Kinder Symptome einer ABO-Erythroblastose aufwiesen, einen breiten Bereich gibt, in dem sich die IgG-Anti-A-Titer überlappen.
Abbildung 19 zeigt den großen Unterschied im Sensibilisierungsniveau zwischen dem Normalkollektiv der O-Schwangeren und den 20 Fällen mit einer O-A-Unverträglichkeit. Jene Fälle, bei denen eine Austauschtransfusion nötig war zeigen eine weitere Anhebung des Sensibilisierungsniveaus.

D. Diskussion

Das DEAE-Sephadex A-50 Gel wurde nach der Beschreibung von WEBB (1972) vorbereitet. Er stellte bei seinen Untersuchungen fest, daß es in der Mehrzahl der Fälle unnötig ist, die IgG-reiche Fraktion auf das Serum-Ausgangsvolumen zurückzukonzentrieren.

In unserer Arbeit wurde versucht den Überstand möglichst wenig weiterzuverdünnen. Man war bestrebt beim Isotonieren mit einer möglichst geringen Menge an Kochsalzlösung auszukommen. Daneben wurde darauf verzichtet, das Gel nach der Herstellung des IgG-reichen Überstands mit 0,02 M Phosphatpuffer zu mischen, um auch das IgG zwischen den Sephadex-Kugeln zu gewinnen. Dies spielt nur eine Rolle, wenn man mit dem Gel, in möglichst großer Ausbeute, IgG gewinnen und reinigen will. Wird es dagegen zum Nachweis von Proteinen, oder speziell zum Nachweis von Antikörpern verwendet, kommt es nicht nur auf die Ausbeute an, sondern auch auf die Verdünnung der in relativ niedrigen Konzentrationen vorliegenden Antikörper, da sich diese oberhalb einer gewissen Verdünnung dem Nachweis entziehen.

WEBB mischte 1 ml Serum mit 5 ml Gel, gab zum Überstand 1 ml 8%ige Kochsalzlösung, 2mal je 1,5 ml 0,02 M Phosphatpuffer, mit dem das Gel zwischen den Gelkugeln ausgewaschen wurde und füllte dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10 ml auf. Mit diesem Gemisch wurde anschließend der indirekte Coombstest durchgeführt. Dies entspricht einer Verdünnung der Serumantikörper von etwa 1:20.

Bei der in unserer Arbeit verwendeten Methode kommt man dagegen mit einer Verdünnung von etwa 1:10 aus, d.h. man gewinnt etwa eine Titerstufe.

Man muß genügend Gel pro ml Serum benutzen, weil es bei einem Übermaß an Serum zu einer starken Schrumpfung des Gels und damit zu einer unvollständigen Bindung der IgM-Antikörper kommt. Eine Verminderung des Gelvolumens wird beobachtet, wenn man die Eiweißbeladung des Gels erhöht.

Ein Verhältnis von 1:5 zwischen zu untersuchendem Serum und Gel führt zu einer maximalen Beladung des Gels (84). GRAHAM (27) untersuchte pro Ansatz 0,05 ml Serum mit 1 ml Gel, dies entspricht einem Verhältnis von 1:20.
Der Normbereich für die IgG-Antikörper-Konzentration im Serum reicht von 800-1800 mg%, für die IgM-Antikörper von 70-280 mg% (7, 18).
Um bei der großen Schwankungsbreite der Protein- und Antikonzentrationen eine Reserve an bindungsfähigem Gel zu haben, wurde bei unserer Untersuchung durch Verwendung von 0,5 ml Serum pro 5 ml Gel ein Verhältnis von 1:10 eingehalten.

GRAHAM (1975) verwendete in seiner Arbeit ebenfalls DEAE-Sephadex A-50 Gel, das auch er nach der Beschreibung von WEBB vorbereitete. Der Überstand weist bei ihm eine Verdünnung der IgG-Anti-A/B-Antikörper von etwa 1:20 auf und wird dann weiter auf 1:500 verdünnt. Nur Seren, die bei 37° C eine hämolytische Aktivität zeigten, wurden auf IgG-Anti-A/B-Antikörper untersucht. 35 von 1765 untersuchten Schwangerenseren der Blutgruppe 0, d.h. 2 % der Seren hatten bei dieser Verdünnung einen positiven Coombstest. Bei 1119 Seren von Müttern der Blutgruppe A und 379 der Blutgruppe B konnte er unter diesen Bedingungen in keinem Fall einen positiven Antiglobulintest erhalten. In 43 % entwickelten die Kinder der Mütter mit diesen hohen Antikörperkonzentrationen Bilirubinspiegel $\geq$ 10 mg%. Bei einem Kind mußte eine Austauschtransfusion durchgeführt werden.

Dies ist eine relativ gute Treffsicherheit. Allerdings findet sich in der Arbeit kein Hinweis, ob die Kinder von Müttern, deren Serum einen negativen Hämolysin- oder Antiglobulintest ergab, auch nicht an einer ABO-Erythroblastose erkrankten.
In unserer Arbeit wurde im Vergleich dazu 0,5 ml Serum mit 5 ml vorbereitetem DEAE-Sephadex A-50 Gel geschüttelt. Dies entspricht also einer Verdünnung von etwa 1:10, d.h. wenn man von der gleichen Annahme ausgeht wie GRAHAM entspricht der Konzentrationstiter von 1:1 wegen der Verdünnung des

Serums bei Mischen mit dem Gel in Wirklichkeit einem Titer von etwa 1:10. Der Verdünnungsstufe 1:500 wäre also etwa ein Endtiter von 1:64 äquivalent. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von GRAHAM fand sich bei den Blutgruppen A und B kein Serum, das diese Titerstufe erreichte. Bei den Seren von Schwangeren der Blutgruppe O konnten jedoch abweichend von der oben zitierten Arbeit bei 19,2 % der Frauen IgG-Anti-A und bei 7,9 % IgG-Anti-B-Antikörper mit einem Konzentrationstiter $\geq$ 1:64 nachgewiesen werden. Eine Ursache dafür könnte in der Art der Durchführung des Coombstests liegen: GRAHAM gibt zu einem Tropfen seines auf 1:500 verdünnten Überstands 2 Tropfen einer 5 %igen Suspension von A- bzw. B-Erythrocyten und einen Tropfen Albumin.

Bei unserer Arbeit wurden pro Ansatz 0,2 ml Überstand mit einem Tropfen, also etwa 0,05 ml, einer 5 %igen Testerythrocytensuspension versetzt. In Wirklichkeit kommt es also beim Antiglobulintest wie ihn GRAHAM durchführt zu einer weiteren Verdünnung der nachzuweisenden Antikörper um 2 Stufen. Der von ihm angegebene Konzentrationstiter von 1:500 müßte also 1:2000 heißen. Diese Verdünnungsstufe entspricht einem Endtiter von 1:256. 2,9 % der Seren von Schwangeren der Blutgruppe O wiesen IgG-Anti-A- und 0,8 % IgG-Anti-B-Antikörper, bei dieser oder höheren Verdünnungsstufen auf. Stellt man den Vergleich unter diesem Blickwinkel an, so gibt es also eine gute Übereinstimmung beider Arbeiten.
Ein entscheidender Nachteil, der von GRAHAM verwendeten Methode liegt darin, daß nur höchste Sensibilisierungen der Mutter erfaßt, schwache, mittlere und selbst hohe Anti-A/B-Antikörperkonzentrationen unerkannt bleiben. Wie man jedoch aus Tabelle 20a entnehmen kann, können auch diese Sensibilisierungen bei einem Teil der Neugeborenen zur Erkrankung an einer ABO-Erythroblastose führen. Dies ist, durchaus verständlich. Das Verfahren wie es GRAHAM beschreibt, erkauft sich also seine, im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden gute Treffsicherheit, mit einer Zunahme der

Dunkelziffer falsch negativer Befunde.

Vergleicht man das in dieser Arbeit verwendete Batch-Verfahren mit den in der Einleitung erwähnten prae- und postnatalen Nachweismethoden für inkomplette Anti-A/B-Antikörper, so kann man feststellen, daß es was die Empfindlichkeit des IgG-Anti-A/B-Antikörpernachweises anbetrifft, mit an der Spitze liegt:
Mit dem AB-Gamma-Test nach FISCHER (21) sind bei der Gruppe der O-Schwangeren in rund 10 % der Fälle Immun-Anti-A/B-Antikörper nachzuweisen, während Sensibilisierungen bei den Blutgruppen A und B nur dann zu finden sind, wenn die A/B-Neutralisationssubstanz genau dosiert, also nicht im Überschuß zugegeben wird (48). Bei 11 gesicherten ABO-Erythroblastose-Fällen fanden MATTHES und SIGRIST (1965) nur drei mal einen, nur in der ersten Stufe positiven, A/B-Gamma-Test. 8 mal war er negativ (49).
Mit DEAE-Cellulose fanden KOCHWA et al. (40) bei 69 % der Mütter mit der Blutgruppe O IgG-Anti-A/B-Antikörper. Die IgG-Anti-A/B-Titer, die man unter Verwendung von DEAE-Cellulose findet, gehen mit denen, die im 2-Merkaptoäthanol-Verfahren gewonnen werden, parallel (24).
KLUGE (1971) übertrifft mit seinem Hitzeresistenz-Proteasen-Test die Empfindlichkeit des Batch-Verfahrens: Er konnte bei 97 % der Mütter mit der Blutgruppe O IgG-Anti-A/B-Antikörper, aber auch bei rund 50 % der Schwangeren der Blutgruppe B IgG-Anti-A und bei 20 % der Mütter mit der Blutgruppe A IgG-Anti-B nachweisen.
Dieses Resultat stimmt für die O-Schwangeren mit den hier vorgelegten Ergebnissen gut überein: Mit dem DEAE-Sephadex A-50-Batch-Verfahren fanden sich bei 96,2 % der O-Schwangeren IgG-Anti-A/B-Antikörper. Dagegen waren nur bei 12,1 % der Seren der Blutgruppe A und 6,8 % der Seren der Blutgruppe B IgG-Anti-B- bzw. Anti-A-Antikörper zu verzeichnen.

Die von WEBB beschriebene Methode ist eine Modifikation des von BAUMSTARK beschriebenen Batch-Verfahrens mit DEAE-Sephadex A-50. WEBB konnte die Zeit zur Gewinnung der iso-

tonischen IgG-reichen Lösung von 3 Std. auf 30 min. reduzieren. Diese Zeit kann mit der bei der vorliegenden Untersuchung verwendeten Modifikation auf etwa 15 min. abgekürzt werden.
Der entscheidende Vorteil des Batch-Verfahrens im Vergleich zu den genannten Methoden liegt also einerseits in seiner hohen Nachweisempfindlichkeit für IgG-Anti-A/B-Antikörper und andererseits darin, daß es sich um eine einfache, leicht und mit wenig Zeitaufwand durchführbare schonende Methode handelt, die sich besonders für die Routine im Rahmen der Schwangerenvorsorge anbietet. Die Vorbereitung des Gels, die etwa einen Tag in Anspruch nimmt, ist relativ zeitaufwendig. WEBB fand jedoch, daß das vorbereitete Gel bei einer Lagerungstemperatur von 4° C nach 4 1/2 Jahren noch eine normale Funktionstüchtigkeit hatte. Man kann sich also durch eine einzige Gelpräparation einen großen Vorrat an Teströhrchen anlegen, die je nach Bedarf verbraucht werden können.
Aus den genannten Gründen ist es auch unnötig das Batch-Verfahren mit einem Screening-Test, wie z.B. dem Hämolysintest zu kombinieren, weil dadurch nur neue Fehlerquellen entstehen.

Die IgG-Proteolyse ist eine Funktion der Temperatur.
In jedem Fall ist das Erhitzen des Serums vor dessen Lagerung unnötig und auch unerwünscht, da unerhitztes steriles Serum bei 5° C oder darunter für lange Zeitspannen gelagert werden kann, ohne daß es zur einer merkbaren Schädigung der IgG-Antikörper kommt. Ein gepooltes Serum zeigte nach einer Zeitdauer von 6 Monaten bei 5° C noch keinen Abfall des IgG (4, 19).
Lagert man frisches Serum bei -90° C, so ist auch nach 3 Monaten kein Komplementabfall festzustellen. Bei -55° C beträgt die Komplementaktivität nach 3 Monaten noch ca. 90 %. Bei -20° C bleibt die Komplementaktivität 2 Wochen lang auf der gleichen Höhe und fällt in den nächsten 10 Wochen auf 40 % des Ausgangswertes ab. Bei 4° C beträgt die Aktivität nach 2 Wochen noch 60 %. Nach 2 Monaten ist kein

Komplement mehr nachweisbar. Bei einer Komplementaktivität von weniger als 60 % besteht die Gefahr schwach komplementbindende Antikörper nicht zu erfassen (25).
Um dem Rechnung zu tragen, erfolgte die Titration der Seren beim Hämolysintest in frischem AB-Serum, das nach der Abnahme portioniert und bei -80° C maximal 3 Wochen gelagert worden war. Das AB-Serum wurde portionsweise aufgetaut und sofort verbraucht.
Die Komplementaktivität war bei den meisten Seren, die Hämolysine enthielten, noch ausreichend hoch. Nur bei einigen Seren fiel die Hämolyse bei der Titerstufe 1:1 d.h. ohne Komplementzugabe, schwächer aus, als bei dem Titer von 1:2.
Bei sämtlichen Seren wurde bei der Titerstufe 1:1 und 1:2 nach Hämolysinen gesucht, um auch die an Komplement verarmten Seren zu erfassen.
Was das IgG anbetrifft, so dürfte durch die Lagerung der Seren für maximal 3 Monate bei -20° C kein nennenswerter Abfall der IgG-Anti-A/B-Aktivität eingetreten sein.

Es bestehen individuelle Unterschiede im Ausmaß der Immunantwort bei gleichem antigenen Stimulus. Nach CRAWFORD und CATBUSH (1952) findet man bei einigen Personen, bei identischer Stimulierung nur einen Anstieg der Isoagglutinine, während sich bei anderen hämolysierende Eigenschaften entwickeln und nur ein geringer Konzentrationsanstieg der Isoagglutinine erfolgt. Auch in der Bildung inkompletter Antikörper findet man eine individuelle Variabilität:
Der Anstieg der inkompletten Antikörper erfolgt nicht immer parallel zu dem der Hämolysine. Bei einigen Personen, die starke Hämolysine entwickelt hatten, war nur ein schwaches Ergebnis im indirekten Coombstest zu verzeichnen und einige, die keine Hämolysine gebildet hatten, zeigten im Antiglobulintest eine starke Reaktion (16).

Auch bei hohen Konzentrationen an Anti-A/B-Hämolysinen in einem Serum, kann man über das Auftreten von Immun-Anti-A/B-Antikörpern keine verbindliche Aussage machen (48).

Bei den Müttern, deren Kinder an einer ABO-Erythroblastose erkrankten, konnte WÖLLNER (1958) dagegen stets Hämolysine nachweisen (20 Fälle) (88).
MATTHES und SIGRIST (1965) fanden bei 6 Seren von O-Müttern mit positivem AB-Gamma-Test und gesunden Kindern nur in einem Fall eine starke hämolytische Aktivität (49).

Man kann also kein allgemein gültiges Schema aufstellen. Bei manchen Seren findet man Hämolysine und keine Anti-A/B-Immunantikörper-Aktivität im Neutralisationstest und bei manchen fehlen die Hämolysine und diese Antikörper sind nachweisbar (89).
Eine Ursache für die individuelle Verschiedenheit der Immunantwort könnte auch an einer graduell unterschiedlichen Ausbildung der Immuntoleranz bei Müttern, die während ihres Fetallebens Kontakt mit A/B-Blutgruppensubstanzen hatten, liegen (36, 43).

Diese Feststellungen stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Wie man aus Abb. 16 entnehmen kann, gibt es bei IgG-Anti-A/B-Titern die kleiner als 1:64 sind, einen erheblichen Prozentsatz an Seren, die keine hämolytische Aktivität ausweisen und dennoch IgG-Antikörper in erheblichen Konzentrationen enthalten. Dies steht im Gegensatz zu der Aussage von FISCHER (1971), daß ein merklicher Anstieg von IgG-Anti-A/B-Aktivität immer vom Auftreten von Hämolysinen begleitet sei (20).

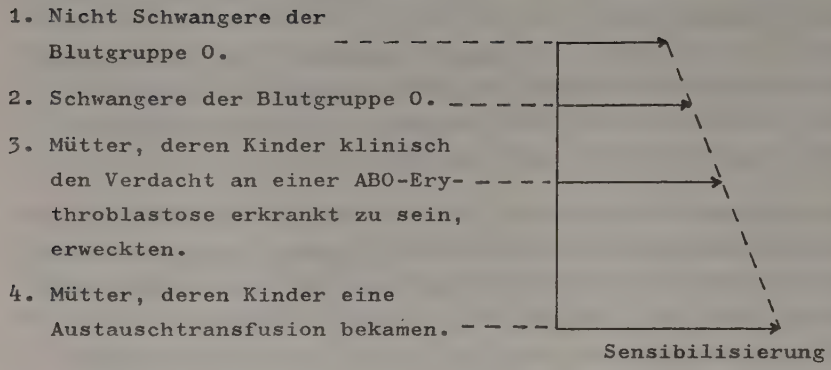
Man kann also feststellen, daß eine erhebliche Sensibilisierung der Mütter mit Bildung von 7 S-Anti-A/B-Antikörpern nachzuweisen sein kann, ohne daß man mit einer relativ unempfindlichen Methode Hämolysine zu finden braucht. Erst bei hohen IgG-Anti-A/B-Antikörperkonzentrationen (Endtiter $\geq$ 1:64), die aber auch in den meisten Fällen von ABO-Erythroblastose für das Krankheitsgeschehen verantwortlich zu machen sind (Tab. 20a, b, c), treten bei allen Seren starke Hämolysine auf.

GRAHAM fand bei 30,9 %, JUNGWIRTH (1955) bei 53 % und

VOAK et al. (1969) bei 62 % der Schwangeren der Blutgruppe O Anti-A/B-Hämolysine.
Das in unserer Arbeit verwendete Testverfahren, mit dem bei 78,7 % der Schwangerenseren der Blutgruppe O Anti-A/B-Hämolysine nachgewiesen werden konnte, hatte also eine ausreichende Nachweis-Empfindlichkeit.

Wie man beim Vergleich der Tabellen 3a und 3b feststellt, ist die Hämolysinbereitschaft der Schwangerenseren der Blutgruppe O gegen A-Erythrocyten um etwa 12 % höher als gegen Erythrocyten der Blutgruppe B. MATTHES (1974) konnte bei seinen Untersuchungen eine Differenz von 20 % feststellen. Bei 43 % der Schwangerenseren konnte er bei der Verdünnung von 1:4 oder darüber Anti-A/B-Hämolysine nachweisen.
Bei unserer Untersuchung waren bei den O-Seren in 32,9 % der Fälle Anti-A/B-Hämolysintiter $\geq$ 1:4 zu verzeichnen.
Die Angaben von MATTHES, der fand, daß die Zunahme der Hämolysinbereitschaft bei Schwangerenseren gegenüber Seren von nichtschwangeren Blutspenderinnen nicht signifikant ist, konnten wir nur bei den Anti-A-Hämolysinen der Blutgruppen O und B bestätigen. Wir fanden dagegen einen signifikanten Unterschied für die gegen Erythrocyten der Blutgruppe B gebildete Aktivität (Tab. 18).

In dieser Arbeit konnte, indem man die empirischen Verteilungen als Geraden und in kumulierter Form darstellte, ein Vergleich der Antikörperkonzentration verschiedener Gruppen über das gesamte Titerspektrum durchgeführt werden. Ein wesentliches Ergebnis war, daß sowohl für die Anti-A/B-Hämolysine als auch für die IgG-Anti-A/B-Antikörper ein Anstieg im Sensibilisierungsniveau bei folgenden Gruppen festgestellt werden konnte:



Wie man aus dieser schematischen Darstellung entnehmen kann, besteht schon bei nichtschwangeren Frauen der Blutgruppe O eine ausgeprägte Grundimmunisierung, die wesentlich über der liegt, die man bei den Müttern der Blutgruppe A und B findet. Abbildung 9 zeigt diesen Sachverhalt.

Neben der Sensibilisierung Schwangerer der Blutgruppe O durch eine inkompatible Schwangerschaft müssen andere meist noch unbekannte Möglichkeiten für einen Kontakt mit A/B-Blutgruppensubstanzen gegeben sein.

50 % aller immunisierten Schwangeren sind Erstgebährende (48, 88). Nur in etwa der Hälfte der Fälle stammen die an einer ABO-Erythroblastose erkrankten Kinder aus einer ersten Schwangerschaft (89). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied im Sensibilisierungsniveau zwischen erst- und mehrgebährenden Frauen festgestellt werden. Es scheint daher nicht so zu sein, daß Mehrgebährende durch den wiederholten Sensibilisierungsprozeß zu einer hohen Antikörperproduktion angeregt werden.

Die durchschnittliche Konzentration der Isoagglutinine erreicht etwa bei den Zwanzigjährigen ihren Höhepunkt, von da an fällt der Durchschnittstiter langsam ab (71). Wenn man annimmt, daß dieser Rückgang des durchschnittlichen Isoagglutinintiters eine gewisse Einschränkung im Ausmaß der Immunantwort auch für die IgG-Antikörperproduk-

tion mit sich bringt, müßte auch der Altersfaktor eine Rolle spielen. Durch Aufteilung der O-Schwangeren in 2 Altersgruppen wurde versucht, dieser Frage nachzugehen. Die Abb. 10 und 11 zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung. Man kann daraus entnehmen, daß die Altersgruppe der unter Sechsundzwanzigjährigen für die IgG-Anti-A-Antikörper ein etwas höheres Sensibilisierungsniveau aufweist, als die älteren Schwangeren, während die Verhältnisse bei den IgG-Anti-B-Antikörpern gerade umgekehrt liegen. Beide Tendenzen sind statistisch nicht signifikant, so daß bei dem begrenzten Altersspektrum der Schwangeren kein Unterschied der Vergleichsgruppen aufgezeigt werden kann.
Bei der Aufschlüsselung der O-Seren nach der Schwangerschaftswoche konnte kein Unterschied, d.h. kein Anstieg des Sensibilisierungsniveau in der 2. Hälfte der Schwangerschaft festgestellt werden (Abb. 14, 15). AMES et al. (1964) beobachteten bei wiederholten Untersuchungen im Laufe der Schwangerschaft, entgegen der Erwartung keinen Anstieg der Isoagglutinine, der Hämolysine und der durch A/B-Blutgruppensubstanzen nicht neutralisierbaren Antikörper (3). Möglicherweise entfalten die kindlichen Sekretorsubstanzen eine neutralisierende Wirkung auf die Antikörper im mütterlichen Kreislauf und maskieren auf diese Weise den Nachweis eines Titeranstiegs. Mit dieser Vorstellung läßt sich ein rascher mütterlicher Antikörperanstieg besonders bei Sekretorkindern post partum in Einklang bringen (67). Noch einleuchtender wäre die Vorstellung, daß die von der Mutter gebildeten IgG-Antikörper transplacentar zum A- bzw. B-Kinde gelangen und hier ohne klinische Folgen gebunden werden. Daß es schon in frühen Stadien der Schwangerschaft zu einer Sensibilisierung bzw. Boosterung der Mutter kommt, beweist die Verschiebung der Geraden für die O-Schwangeren, im Vergleich zu denen für die Gruppe der nichtschwangeren Frauen, nach links, d.h. zu höheren Titern (Abb. 17). Der Unterschied im Grad der Immunisierung wird auch durch das signifikant häufigere Auftreten von Anti-A/B-Hämolysinen bei den Schwangeren verdeutlicht (Tab. 18).

Ein wichtiger Faktor beim Krankheitsgeschehen der ABO-Erythroblastose liegt, neben dem Antikörpertiter der Mutter, in der Ausreifung der kindlichen erythrocytären Antigene. Selbst hohe mütterliche IgG-Anti-A/B-Antikörpertiter bleiben ohne klinische Relevanz, wenn sich die Antikörper nicht an die kindlichen Erythrocyten binden können. Es ist also wichtig, die Antigenstärke der kindlichen Erythrocyten bei jeder Betrachtung der Beziehung zwischen dem IgG-Antikörpertiter und den Schutzmechanismen zu berücksichtigen (82).

Die Ausreifung der Leberfunktion kann daneben bei den Fällen mit hohem mütterlichem Antikörperspiegel und relativ gut entwickelten erythrocytären Antigenen, bei denen das Neugeborene dennoch nicht erkrankt, eine große Rolle spielen.

Im Abschnitt Pathogenese der ABO-Erythroblastose ist die Interaktion und Verflechtung dieser und noch weiterer Faktoren im Rahmen der Einleitung ausführlich besprochen worden.

Die komplexe Verflechtung von vielfach noch unbekannten individuellen Variablen bei der Anregung zur Antikörperbildung führt zu einem Spektrum unterschiedlicher Konzentrationstiter, an dessen einem Ende Personen stehen, bei denen man keine IgG-Anti-A/B-Antikörper nachweisen kann, und deren anderes Ende von jenen eingenommen wird, deren Seren extrem hohe Konzentrationen an diesen Antikörpern enthalten.

Wollte man eine zuverlässige Vorhersage über das Erkrankungsrisiko eines Neugeborenen, das aus einer heterospezifischen Schwangerschaft stammt, treffen, müßte man also neben dem mütterlichen IgG-Anti-A/B-Antikörper-Spiegel möglichst viele pathogenetisch wichtige Parameter, wie z.B. die Entwicklung der Erythrocytenantigene, der Sekretoreigenschaft oder die Exkretionsleistung der Leber des Neugeborenen für Bilirubin kennen.
Man kann sich jedoch auch damit begnügen, praenatal im Rahmen der Schwangerenvorsorgeuntersuchung im Serum der

Mutter nach IgG-Anti-A/B-Antikörpern zu suchen und deren Konzentrationstiter zu bestimmen. Unsere Vorstellungen kommen dem von ROSER (1968) angegebenen Schema sehr nahe. Es soll an dieser Stelle in modifizierter Form wiedergegeben werden:

1. Nachweis und Titerbestimmung der IgG-Anti-A/B-Antikörper mit dem DEAE-Sephadex A-50-Batch-Verfahren.
2. Können diese Antikörper in mittlerer oder hoher Konzentration nachgewiesen werden, sollte die Blutgruppe des Vaters bestimmt werden.
3. Besteht die Möglichkeit, daß eine heterospezifische Schwangerschaft vorliegt, wird der Hausarzt verständigt.
4. Nach der Entbindung sollte dann in den ersten Lebenstagen regelmäßig der Bilirubinspiegel kontrolliert werden.
5. Überschreitet dieser die kritische Grenze so führt man eine Therapie durch.

Klinische Erfahrungen mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode über einen längeren Zeitraum werden nötig sein, um eine Grenze zwischen IgG-Anti-A/B-Antikörpertitern, die für das Kind ungefährlich sind und solchen zu finden, die bei wenig entwickelten Schutzmechanismen zur Erkrankung des Neugeborenen führen. Die Ergebnisse aus dem Vergleich der 27 Seren von Müttern, deren Kinder frühzeitig eine Hyperbilirubinämie entwickelten, mit dem Normalkollektiv schwangerer Frauen, können nur vorläufige Richtpunkte auf der Konzentrationstiterskala setzen.
Nach diesen Feststellungen bestünde ab einem Endtiter von 1:16 die Gefahr, daß das Neugeborene eine ABO-bedingte Hyperbilirubinämie entwickelt. Erst bei mütterlichen Konzentrationstitern von 1:128 oder darüber, bestand beim Neugeborenen die Gefahr so hohe Bilirubinspiegel zu entwickeln, daß eine Austauschtransfusion nötig wurde.

Bei den quantifizierenden Verfahren finden sich fließende Übergänge zwischen der Gruppe von Müttern, deren Kinder an einer ABO-Unverträglichkeit erkrankt sind und jener mit gesunden Kindern (88).

Wie man aus Abb. 18 entnehmen kann, gibt es zwischen den Antikörpertitern von Schwangeren und denen der Mütter, deren Kinder neonatal eine, das physiologische Maß übersteigende Hyperbilirubinämie entwickelten, eine Überlappung, obwohl wie es aus Abb. 19 gut ersichtlich ist, ein erheblicher Unterschied im Sensibilisierungsniveau zwischen beiden Gruppen besteht. Der Unterschied ist signifikant (Tab. 21a).

FONG et al. (1966) fanden bei Kindern, die an einer ABO-Erythroblastose erkrankt waren, ebenfalls signifikant höhere IgG-Anti-A-Titer als bei einer Kontrollgruppe von Müttern mit gesunden Kindern. Die Serumtiter in beiden Gruppen wiesen trotz dieser Signifikanz eine erhebliche Überlappung auf (24).
Verschiedene Untersucher konnten diese Korrelation zwischen dem IgG-Anti-A/B-Antikörpertiter und dem Auftreten einer ABO-Erythroblastose feststellen (11, 27, 32, 77, 82). Auch zwischen der Schwere des Krankheitsbildes und dem mütterlichen IgG-Anti-A/B-Antikörperspiegel konnten manche Untersucher eine Korrelation aufzeigen (59, 77). Bei Müttern, deren Kinder eine Austauschtransfusion benötigten, fanden POLLEY et al. (1965) signifikant höhere IgG-Anti-A-Titer als bei Müttern, deren Kinder an einer milden Verlaufsform der ABO-Erythroblastose erkrankten.
HASEKURA (1974), der eine 2-Merkaptoäthanol-Technik zur Untersuchung des mütterlichen Serums anwendete, und aus der Stärke des Reaktionsausfalls beim Antiglobulintest eine Vorhersage der Erkrankung des Kindes an einer ABO-Erythroblastose zu machen versuchte, konnte nur bei jenen Seren von Schwangeren eine befriedigende Aussage machen, die hohe Anti-A/B-Antikörperkonzentrationen im Serum hatten und damit ein stark positives Testergebnis lieferten. Bei mittlerem Reaktionsausfall wird die Zahl der falsch positiven Vorhersagen so hoch, daß eine Aussage kaum mehr möglich ist.

Damit können die bei dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse in Einklang gebracht werden. Abbildung 19 zeigt die Probitgeraden der IgG-Anti-A/B-Endtiterverteilungen bei

schwangeren Frauen, bei Müttern, deren Kinder an einer ABO-Erythroblastose erkrankten, und bei Fällen, wo eine Austauschtransfusion nötig war in vergleichender Darstellung. Man kann daraus entnehmen, daß das Sensibilisierungsniveau der Gruppe der Erkrankten wesentlich höher ist, als das des Vergleichskollektivs der 239 Schwangeren der Blutgruppe O. Daneben ist bei den Müttern jener Neugeborenen, die eine Austauschtransfusion benötigten dieses Niveau weiter angehoben. Vergleicht man diese Gruppen mit dem Vierfelder-Test an dem für jedes verglichene Paar gemeinsamen geschätzten Mediantiter, so findet man, daß jene Seren, die aus unverträglichen Schwangerschaften stammten, hochsignifikant ($p = 0{,}01$) mehr IgG-Anti-A-Titer 1:16 aufweisen, als die Vergleichsgruppe der Schwangeren der Blutgruppe O. Ferner konnte man bei den Müttern, deren Kinder eine Austauschtransfusion erhielten, signifikant mehr Titer $\geq$ 1:512 finden, als bei der Gruppe der 27 Seren oder den Seren, die aus einer O-A-(Mutter Blutgruppe O; Kind Blutgruppe A) unverträglichen Schwangerschaft stammten (Tab. 21a).

Alle Untersucher, die versuchten an Hand höchster IgG-Anti-A/B-Antikörperkonzentrationen im mütterlichen Serum eine Vorhersage der Erkrankung des Kindes an einer ABO-Unverträglichkeit zu treffen, lassen einen großen Bereich des Titerspektrums außer Auge, der bei entsprechender pathogenetischer Konstellation des Neugeborenen auch noch zur Erkrankung des Kindes führen kann (Tab. 20). Sie nehmen damit bei relativ guter Treffsicherheit eine erhebliche meist unbekannte Zahl falsch negativer Befunde in Kauf (27, 32, 49). Die Schwierigkeit besteht darin, einen Titer zu definieren, ab dem bei durchschnittlich ausgeprägten schützenden Mechanismen, eine ABO-Unverträglichkeit auftreten kann (83). Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Ansatzpunkte um dieses Problem durch weitere klinische Erfahrungen mit dem Batch-Verfahren lösen zu können.

E: Zusammenfassung

Mit einem Batch-Verfahren unter Verwendung von DEAE-Sephadex A-50 wurden 507 Seren von schwangeren Frauen der Blutgruppen A, B und 0 und 27 Seren von Müttern, deren Kinder Symptome einer ABO-Erythroblastose aufwiesen, auf IgG-Anti-A/B-Antikörper untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Schwangeren mit der Blutgruppe 0 hochsignifikant ($p = 0,01$) häufiger IgG-Anti-A/B-Antikörper in nachweisbaren Konzentrationen enthalten als die Schwangeren der Blutgruppen A und B. Zwischen den Blutgruppen A und B konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden.

Zwischen dem Normalkollektiv der Schwangeren und den 27 Seren von Müttern, deren Kinder an einem Morbus haemolyticus neonatorum erkrankten, gibt es für die IgG-Anti-A/B-Endtiter eine erhebliche Überlappung. Der Titerbereich des Normalkollektivs reichte von 1:1 bis 1:1024, jener der 27 Seren von 1:16 bis 1:16000. Das Sensibilisierungsniveau der 27 Mütter lag signifikant ($p = 0,01$) über dem der Vergleichsgruppe der 507 Schwangeren. Ferner konnte bei jenen 10 Fällen aus der Gruppe der 27 Mütter mit erkrankten Kindern, bei denen eine Austauschtransfusion durchgeführt werden mußte, eine weitere signifikante ($p = 0,05$) Anhebung im Sensibilisierungsniveau beobachtet werden.

Beim Vergleich eines Normalkollektivs nicht schwangerer Spenderinnen, bei denen in einer parallelen Untersuchung unter Verwendung der selben Methode die IgG-Anti-A/B-Endtiter bestimmt wurden, konnte für die Blutgruppe A und bei der Blutgruppe 0 für die IgG-Anti-B-Antikörper ein signifikant ($p = 0,05$) häufigeres Auftreten von IgG-Anti-B-Antikörpern bei den Schwangeren festgestellt werden. Bei den IgG-Anti-A-Antikörpern der Blutgruppen B und 0 konnte statistisch kein Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Sämtliche Seren wurden auf Anti-A/B-Hämolysine untersucht. Erst ab einem IgG-Anti-A/B-Titer von 1:64 waren mit der verwendeten Methode in jedem Fall Hämolysine zu finden.

Wie andere Autoren können wir uns aufgrund unserer Untersuchungsergebnisse der Auffassung anschließen, daß die klinische Manifestation einer Unverträglichkeit im Bereich des ABO-Systems im Einzelfall kaum durch irgendwelche serologische Untersuchungen vorausgesagt werden kann. Dazu sind die Voraussetzungen für ein derartiges krankhaftes Geschehen zu vielschichtig, als daß die Bestimmung eines einzigen Parameters (z.B. Bestimmung der IgG-Anti-A/B-Titer) eine verläßliche Aussage über Auslösung und Verlauf erlauben könnte. Die serologischen Aussagen beziehen sich immer auf eine statistische Möglichkeit, die für den Einzelfall mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zutreffen kann.
Das von uns angewandte Verfahren zur Erfassung der IgG-Anti-A/B-Antikörper ist hinsichtlich einfacher Durchführbarkeit und guter Empfindlichkeit anderen vorzuziehen. Während andere Autoren zugunsten einer größeren Treffsicherheit auf eine möglichst große Empfindlichkeit verzichten, sind wir der Meinung, daß gerade empfindliche Methoden heranzuziehen sind, wenn der Kreis der unter Umständen gefährdeten Schwangerschaften, erfaßt werden soll. Weitere Untersuchungen als Fortsetzung unserer Arbeit sollen vorbehalten bleiben, jene Titergrenze der vorhandenen IgG-Anti-A/B-Antikörper zu definieren, unterhalb der eine klinische Manifestation einer ABO-Unverträglichkeit in jedem Fall unterbleibt.

F. Statistik

1) Vierfeldertest (X^2- Test)

Vierfeldertafel:

	Ereignis eingetreten		Σ
	ja	nein	
1. Stichprobe	a	b	n_1
2. Stichprobe	c	d	n_2
Σ	r	s	n

Hierbei sind b und d jeweils die Anzahl der Beobachtungen, bei denen das Ereignis nicht eingetreten, a und c die Anzahl der Beobachtungen, bei denen das Ereignis eingetreten ist.

n_1: Umfang der Stichprobe 1

n_2: Umfang der Stichprobe 2

$r = a\ c$

$s = b\ d$

$n = r\ s = n_1\ n_2$

Nullhypothese (H_o): Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der Ereignisse ist in beiden Gruppen gleich.

Alternativhypothese: Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der Ereignisse ist in beiden Gruppen nicht gleich.

Zur Überprüfung von H_o dient folgendes Prüfmaß:

$$\frac{(| ad - bc | - \frac{n}{2})^2\ n}{rsn_1n_2}$$

H_o wird verworfen, wenn das Prüfmaß größer als $X^2_{1;1-}$ ist, d.h. für die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (p=0,05) wird, bei einem Freiheitsgrad, H_o verworfen, wenn das Prüfmaß größer als 3,84 ist. Ist das Prüfmaß größer als 6,63, so wird H_o mit der Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % (p=0,01)

verworfen (90,91).

Verglichene Paarungen (IgG-Anti-A/B-Antikörper)	geschätzter Mediantiter	Prüfmaß
Blutgruppe A / Blutgruppe B	-	0,8
Blutgruppe A / Blutgruppe 0 (Anti-B)	-	237,4
Blutgruppe B / Blutgruppe 0 (Anti-A)	-	190,4
Alter bis 25 / Alter 26 (Anti-A)	1:16	0,9
Alter bis 25 / Alter 26 (Anti-B)	1:8	2,5
Erstgebährende / Mehrgebährende (Anti-A)	1:16	0,2
Erstgebährende / Mehrgebährende (Anti-B)	1:8	0,2
bis 19. Woche / 20. bis 40. Woche (Anti-A)	1:16	1,8
bis 19. Woche / 20. bis 40. Woche (Anti-B)	1:8	0,2
27 Seren mit Verdacht / Austauschtransfusion	1:512	18,0
Blutgruppe 0 / 0-A-Unverträglichkeit (Anti-A)	1:16	48,8
0-A-Unverträglichkeit / Austauschtransfusion	1:512	4,2
Blutgruppe 0 (Anti-A) / Blutgruppe 0 (Anti-B)	1:8	4,9

Tabelle 21a: Im Vierfeldertest verglichene Paare (IgG-Anti-A/B-Antikörper) .

Schätzung des für zwei verglichene Gruppen gemeinsamen Mediantiters:
Indem man die kumulierten Häufigkeiten (jeder Titerstufe) der zwei verglichenen Verteilungen addiert und durch 2 divi-

diert, erhält man die für dieses Paar gemeinsame Verteilung der kumulierten Häufigkeiten. Jene Titerstufe, der der 50 % - Wert am nächsten kommt, ist der geschätzte gemeinsame Mediantiter.

Verglichene Paarungen (Anti-A/B-Hämolysine)	geschätzter Mediantiter	Prüfmaß
Blutgruppe A / Blutgruppe B	-	1,1
Blutgruppe A / Blutgruppe O (Anti-B)	-	2,0
Blutgruppe B / Blutgruppe O (Anti-A)	-	3,9
Blutgruppe O (Anti-A) / Blutgruppe O (Anti-B)	-	2,7
Blutgruppe A / Blutgruppe O (Anti-A/B)	-	19,8
Blutgruppe B / Blutgruppe O (Anti-A/B)	-	10,9

Tabelle 21b: Im Vierfeldertest verglichene Paare (Anti-A/B-Hämolysine) .

Konnte kein gemeinsamer Mediantiter ermittelt werden, so wurde der Vierfeldertest beim Titer 1:1 durchgeführt.

2) Probitanalyse

Die Darstellung der empirischen Verteilungen als Probitgeraden entspricht der Darstellung auf Wahrscheinlichkeitspapier. Trägt man im Wahrscheinlichkeitsnetz auf der Abszisse die Titerstufen und auf der Ordinate die kumulierten Häufigkeiten auf, so liegen die Punkte annähernd auf einer Geraden, wenn eine Normalverteilung vorliegt.
Jeder prozentualen Häufigkeit ist ein Probit zugeordnet. Die Probits werden aus dem Wahrscheinlichkeitsintegral abgeleitet. Zum Probit 5 gehört die kumulierte Häufigkeit 50 %, zum

Probit 6 die kumulierte Häufigkeit 84 % und zum Probit 4 die kumulierte Häufigkeit 16 %.
Ausgehend vom Probit 5 kann man für jede Gerade auf der Abszisse den Logarithmus des Mediantiters ablesen.
Die Steigung der Probitgerade ist ein Maß für die Streuung (Varianz) der Normalverteilung um den Mediantiter. Je steiler eine Gerade verläuft, um so kleiner ist die Streuung.
Wie in Abbildung 20 dargestellt, ist jedem eingezeichneten empirischen Probit eine definierte Verdünnungsstufe auf der Abszisse zugeordnet.

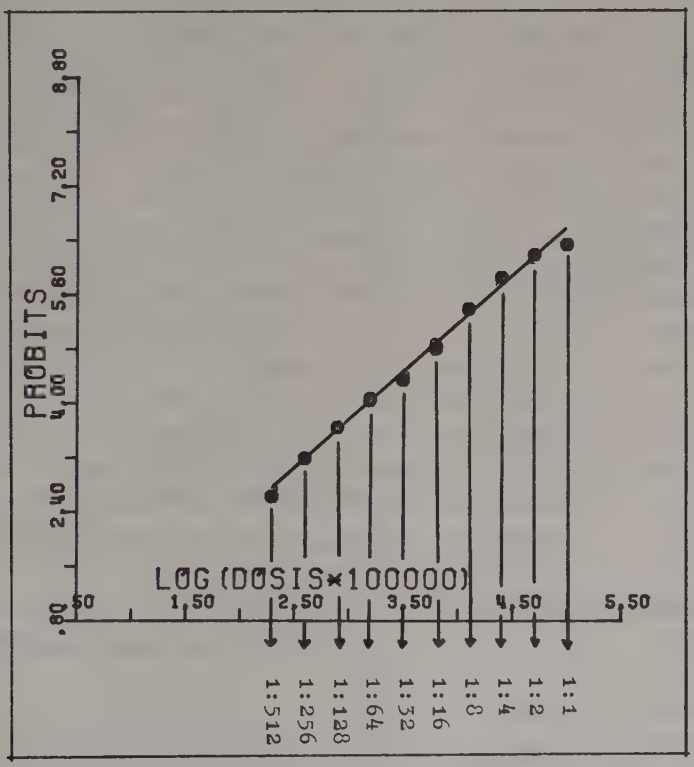


Abbildung 20: Zusammenhang zwischen den Punkten auf der Probitgerade und den Titerstufen auf der Abszisse.

Tabelle 22 zeigt die vom Computer für die verschiedenen Probitgeraden berechneten Werte.

Untersuchte Gruppe	p=0,05 UG	p=0,05 OG	p=0,01 UG	p=0,01 OG	Median-titer	y = ax + b a	b
Bg. A Hl.	0,771	1,324	0,671	1,521	1,01	1,4	-1,4
Bg. B Hl.	0,456	0,990	0,354	1,276	0,672	1,7	-2,4
Bg. O Hl. (Anti-A)	0,485	0,641	0,452	0,689	0,558	1,9	-3
Bg. O Hl. (Anti-B)	0,668	0,998	0,602	0,110	0,816	1,6	-2
Bg. A IgG	2,999	38,0	1,561	73,12	10,68	1,1	-1
Bg. B IgG	0,004	$3 \cdot 10^{6}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{9}$	122,1	0,7	0,2
Bg. O IgG (Anti-A)	0,061	0,077	0,058	0,080	0,068	1,4	0,2
Bg. O IgG (Anti-B)	0,132	0,170	0,125	0,179	0,149	1,4	-0,1
Bg. O IgG Alt. bis 25 (Anti-A)	0,064	0,090	0,060	0,097	0,076	1,4	0,3
Bg. O IgG Alt. bis 25 (Anti-B)	0,158	0,233	0,145	0,254	0,192	1,3	-0,1
Bg. O IgG Alt. 26 (Anti-A)	0,144	0,214	0,133	0,232	0,176	1,2	1,1
Bg. O IgG Alt. 26 (Anti-B)	0,104	0,147	0,097	0,158	0,124	1,4	-0,1
Bg. O IgG Erstgebäh. (Anti-A)	0,037	0,063	0,034	0,07	0,048	1,4	0,5
Bg. O IgG Erstgebäh. (Anti-B)	0,099	0,175	0,087	0,199	0,132	1,4	-0,1
Mehrgebäh. Bg O IgG (Anti-A)	0,052	0,084	0,047	0,093	0,066	1,5	0,3
Bg O IgG Mehrgebäh. (Anti-B)	0,091	0,163	0,079	0,163	0,121	1,3	0,5

Untersuchte Gruppe	p=0,05 UG	OG	p=0,01 UG	OG	Median-titer	y = ax + b a	b
Bg O IgG - 19. Woche (Anti-A)	0,045	0,065	0,042	0,07	0,054	1,4	0,4
Bg O IgG - 19. Woche (Anti-B)	0,119	0,178	0,108	0,195	0,145	1,4	-0,2
Bg O IgG 20.-40. Woch. (Anti-A)	0,069	0,107	0,063	0,118	0,086	1,5	-0,1
Bg O IgG 20.-40. Woch. (Anti-B)	0,138	0,250	0,121	0,285	0,186	1,2	0,6
Austausch (Anti-A/B)	$6 \cdot 10^{-4}$	$16 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	1,8	2,2
O-A-Unverträglichkeit	$1 \cdot 10^{-3}$	$25 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$3 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	1,7	1,9

Tabelle 22: Ergebnisse der Probitanalyse bei den untersuchten Gruppen.
Bg = Blutgruppe / Hl = Hämolysine / IgG = IgG-Anti-A/B-Antikörper / Alt. = Alter
Für den Mediantiter ist jeweils das Vertrauensintervall mit oberer Grenze (OG) und unterer Grenze (UG) für die Irrtumswahrscheinlichkeiten 1 % und 5 % angegeben. Zusätzlich kann man die Gleichung der Probitgeraden entnehmen.

Näheres über dieses Verfahren ist der Literatur zu entnehmen (90).

G. Literaturverzeichnis

1. ALTER, A.A., FELDMAN, F., TWERSKY, J., DE VOS, E., PRUTTING, D.L., MIOTTI, A. and BRYAN, D.E.: Direct antiglobulin test in ABO hemolytic disease of the newborn. Obstet. and Gynec. 33, 846-851 (1969)
2. ALTER, A.A., PRUTTING, D.L., HERTZ, S. and BRYAN, D.E.: Serologic specifity of the positive direct antiglobulin test in ABO heterospecific pregnancies. Obstet. and Gynec. 34, 102-105 (1969)
3. AMES, A.C. and LLOYD, R.S.: A sheme for the ante-natal prediction of ABO haemolytic disease of the newborn. Vox Sang. 9, 712-722 (1964)
4. ART, G.P. and FINLAYSON, J.S.: Stability of immune serum globulin during storage. Effects of prior heating. Vox Sang. 17, 419-433 (1969)
5. BAUMSTARK, J.S., BARDAWIL, W.A., SABARRA, A.J. and HAYES, N.: Purifikation of pancreatopeptidase E by batch seperation on DEAE-Cellulose. Biochem. Biophys. Acta 77, 676-679 (1963)
6. BAUMSTARK, J.S., LAFFIN, R.J. and BARDAWIL, W.A.: A preparative method for the separation of 7S gamma globulin from human serum. Arch. Biochem. Biophys., 108, 514-522 (1964)
7. BECKER, W. and STÖRIKO, K.: Immunological determination of immunglobulins: Normal Values and preparation of a standard. Progr. Immunol. Standard, 4, 129-135 (1970)
8. BOORMAN, K.E., DODD, B.E. and MOLLISON, P.L.: Isoimmunisation to the blood group factors A, B and Rh. J. Path. Bact., 57, 157-169 (1945)
9. BRAMBELL, R.: The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunglobulins. Lancet ii, 1087-1093 (1966)
10. BUBE, F.W.: Zur serologischen Diagnostik der ABO-Erythroblastose. Zschr. für Kinderheilk., 95, 231-236 (1966)

11. CARAPELLA-DE LUCA, E., PACIONI, C. and TONELLI, C.: The titre of IgG-Anti-A/B in the serum of group O mothers of incompatible infants with early neonatal jaundice.
Vox Sang., 30, 200-203 (1976)
12. CLARKE, C.A.: Blood group incompatibility between mother and foetus.
Clin. Science, 43, 1-11 (1972)
13. COHEN, P. and HUDSON, H.H.: Blood group substances A and B. Levels in placental and venous immune globulins.
Vox Sang., 21, 311-318 (1971)
14. COHEN, B.H. and MELLITS, E.D.: Blood group incompatibility and immunglobulin levels.
Johns. Hopkins Med. J., 128/6, 318-331 (1971)
15. COOMBS, R.R.A., MOURANT, A.E. and RACE, R.R.: Detection of weak and incomplete Rh-agglutinins: A new test.
Lancet, 2, 15-16 (1945)
16. CRAWFORD, H., CUTBUSH, M., FALCONER, H. and MOLLISON, P.L.: Formation of immune A iso-antibodies with special reference to heterogenetic stimuli.
Lancet ii, 727, 219-223 (1952)
17. DIENST, A.: Das Eklampsiegift.
Zentralbl. Gynäk., 29, 253-263 (1905)
18. FAHEY, J.L. and LAWRENCE, M.E.: Quantitative determination of 6,6S gamma globulins and macroglobulins in human serum.
J. Immunol., 91, 597-603 (1963)
19. FINLAYSON, J.S. and ARMSTRONG, B.L.: Stability of IgG during storage of human serum.
Vox Sang., 23, 222-227 (1972)
20. FISCHER, K.: What is the optimal serological analysis of hemolytic disease of the newborn due to ABO-incompatibility.
Vox Sang., 20, 184-186 (1971)
21. FISCHER, K. und LURATI, M.: Eine Methode zur Unterscheidung natürlich vorkommender Antikörper von Immunantikörpern für die Diagnose der ABO-Erythroblastose (AB-Gamma-Test)
Klin. Wschr., 37, 493-495 (1959)

22. FISCHER, K. and STEGE, N.: On the pathogenesis of ABO-erythroblastosis: Demonstration of quantitative variations in the power of neonatal erythrocytes to combine with antibody, using the immunofluorescent technique. Vox Sang., 12, 145-150 (1967)
23. FLODIN, P. and KILLANDER,J.: Fractionation of human serum proteins by gel filtration. Biochem. et Biophys. Acta, 63, 403-410 (1962)
24. FONG, S.W., NUCKTON, A. and FUDENBERG, H.H.: Characterization of maternal isoagglutinins in ABO hemolytic disease of the newborn. Blood, 27, 17-37 (1966)
25. GARRATTY, G.: The effects of storage and heparin on the activity of serum complement, with particular reference to the detection of blood group antibodies. Amer. J. Clin. Path., 54/4, 531-538 (1970)
26. GOLD, E.R., FUDENBERG, H.H. and TOVEY, G.H.: A three step screening test for ABO haemolytic disease. Int. Arch. Allergy, 35, 345-352 (1969)
27. GRAHAM, H., MORRISON, M. and MAC ANDREW, R.: A simple method for the prediction of ABO incompatibility using Sephadex A-50. Vox Sang., 29, 371-377 (1975)
28. GREEN, H., BARROW, P. and GOLDBERG, B.: Effect of antibody and complement on permeability control in ascites tumor cells and erythrocytes. J. Exp. Med., 110, 699-713 (1959)
29. GUSDON, J.P.: Fetal and maternal immunglobulin levels during pregnancy. Obstet. and Gynec., 103, 895-900 (1969)
30. GUSDON, J.P., LEAKE, N.H., PRICHARD, R.W. and RHYNE, A.L.: Amniotic fluid antibody titers and other prognostic parameters in erythroblastosis. Amer. J. Obstet. Gynec., 108, 85-90 (1970)
31. HALBRECHT, I.: Role of hemoagglutinins anti-A and anti-B in pathogenesis of jaundice of the newborn. Am. J. Dis. Child., 68, 248-249 (1944)

32. HASEKURA, H.: Mercaptoethanol - stable antibody test predicting hemolytic disease of the newborn due to ABO incompatibility.
Vox Sang., 26, 439-448 (1974)

33. HOSTRUP, H.: Influence of A and B blood group substances on the 7S fraction of anti-A and anti-B.
Vox Sang., 8, 567-582 (1963)

34. HSU, C.S., ROSENFIELD, R.E. and RUBINSTEIN, P.: Instrumented PVP - augmented antiglobulin test.
Vox Sang., 26, 326-333 (1974)

35. HUGHES-JONES, N.C., IVONA, M., ELLIS, J. and WALKER, W.: Anti-D concentration in mother and child in haemolytic disease of the newborn.
Vox Sang., 21, 135-140 (1971)

36. JAKOBOWICZ, R., CRAWFORD, H., GRAYDON, J.J. and PINDER, M.: Immunological tolerance within the ABO blood group system.
Brit. J. Haemat., 5, 232-244 (1959)

37. JUNGWIRTH, J.: Beobachtungen über den Placentarübertritt der menschlichen Isoantikörper des ABO-Blutgruppensystems mit besonderer Berücksichtigung der Hämolysine.
Blut, 1, 165-184 (1955)

38. KEUTH, U. und PARTENER, A.: Untersuchungen über den Wiederanstieg des Serumbilirubins nach der Austauschtransfusion sowie zur Frage des optimalen Intervalls.
Zschr. Kinderheilk., 83, 195-199 (1959)

39. KLUGE, A.: Immun-A/B-Antikörper-Nachweis.
Fortschr. Med., 89, 1003-1006 (1971)

40. KOCHWA, S., ROSENFIELD, R.E., TALLAL, L. and WASSERMAN, L.R.: Isoagglutinins associated with ABO erythroblastosis.
J. Clin. Invest., 40, 874-883 (1961)

41. KOHLER, P.F. and FARR, R.S.: Elevation of cord over maternal IgG immunglobulin: Evidence for an active placental IgG transport.
Nature, 210, 1070-1071 (1966)

42. NEUMÜLLER, O.A.: Kompps Chemielexikon Bd. 5, 7. Aufl.
Stuttgart: Franckh'sche Verlagsbuchhandlung (1975)

43. KONUGRES, A.A.: Immunulogical toleramce of the A and B antigens.
Bibl. Haemat., 19, 746-750 (1964)

44. LANDSTEINER, K.: Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes.
Wien. klin. Wchnschr., 14, 1132-1134 (1901)

45. LANDSTEINER, K. and WIENER, A.: An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood.
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 43, 223 (1940)

46. LEVINE, P., NEWARK, N.J., BURNHAM, L., ENGLEWOOD, N.J., KATZIN, E.M. and VOGEL, P.: The role of iso-immunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis.
Amer. J. Obstet. and Gynec., 42, 925-937 (1941)

47. LUKENS, J. N.: Haemolytic disease of the newborn (Erythroblastosis fetalis):
Current Pediat. Therap. (Gellis and Kagan), Sounders Company, Philadelphia London Toronto, 258-262 (1973)

48. MATHES, H.: Nachweis von Immunisierungen im ABO System. Vergleichende Untersuchungen bei Schwangeren, männlichen und nicht schwangeren weiblichen Blutspendern.
Inaugural-Dissertation, Tübingen (1974)

49. MATTHES, M. and SIEGRIST, D.: Vergleichende Untersuchungen zur serologischen Diagnostik der ABO-Erythroblastose.
Bibl. Haemat., 20, 260-265 (1965)

50. MOLLISON, P.L.: The role of complement in the antibody-mediated red-cell destruction.
Brit. J. Haemat., 18/3, 249-255 (1970)

51. MORELL, A., SKVARIL, F., VAN LOGHEM, E. and KLEEMOLA, M.: Human IgG subclasses in maternal and fetal serum.
Vox Sang., 21, 481-492 (1971)

52. MUNK-ANDERSEN, G.: A dextran serum medium for the demonstration of incomplete anti-A and anti-B.
Acta Path. Microb. Scand., 38, 259-272 (1956)

53. OPITZ, H. und SCHMIDT, F.: Handbuch der Kinderheilkunde.
Springer Verlag Heidelberg (1966)

54. OTTENBERG, R.: The etiology of eclampsia.
J. A. M. A., 81, 295-297 (1923)

55. PATTISON, J.R. and MACE J.E.: A simple inexpensive gel filtration technique for use in diagnostic serology.
J. Clin. Path., 26/4, 309-311 (1973)

56. PIROFSKY, B. and ROSNER, E.R.: DTT Test: A new method to differentiate IgM and IgG erythrocyte antibodies.
Vox Sang., 27, 480-488 (1974)

57. POLACEK, K.: Die frühzeitige Indikationsstellung zur Austauschtransfusion bei haemolytischen Neugeborenenerkrankungen.
Mschr. Kinderheilk., 111, 6-10 (1963)

58. POLAYES, S.H.: Erythroblastosis fetalis in mothers with Rh- positive blood.
Am. J. Dis. Child., 69, 99-102 (1945)

59. POLLEY, M.J., MOLLISON, P.L. and WALKER, W: A simple serological test for antibodies causing ABO-haemolytic disease of the newborn.
Lancet 1, 291-295 (1965)

60. RACE, R.R.: An incomplete antibody in human serum.
Nature, 153, 771-772 (1944)

61. REESINK, H.W., VAN DER HART, M. and VAN LOGHEM, J.J.: Evaluation of a simple method for determination of IgG titre anti-A or -B in cases of possible ABO-blood group incompatibility.
Vox Sang., 22, 397-407 (1972)

62. RICHON, J., STREIFF, F., GENETT, B., LANDES,P., BRUNEL, G., RAFFOUX, C., PIERRON, N., PETRY, J.M. et SCHWEITZER, M.: Interet de la reaction Coombs-Bromeline dans les incompatibilites sanguines foeto-maternelles ABO.
Bull. Fed. Soc. Gynec. Obstet., 22/5, 533-537 (1970)

63. ROMANO, E.L., HUGHES-JONES, N.C. and MOLLISON, P.L.: Direct antiglobulin reaction in ABO-haemolytic disease of the newborn.
Brit. Med. J., 1, 524-526 (1973)

64. ROSENFIELD, R.E.: A-B hemolytic disease of the newborn.
Blood, 10, 17-28 (1955)

65. ROSER, H.: Erfahrungen bei Einbeziehung routinemäßiger Untersuchungen von Immunantikörpern im ABO-System in das Schwangerenvorsorgeprogramm.
Blut, 17, 139-143 (1968)

66. SCHIFF, F. und SASAKI, H.: Über die Vererbung des serologischen Ausscheidungstypus.
Zschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap., 77, 129-139 (1932)

67. SCHNEEWEISS, B. und WERNITZ, C.: Untersuchungen zur Pathogenese der ABO-Inkompatibilität der Neugeborenen.
Zbl. Gynäk., 89, 1269-1275 (1967)

68. SKRZYPULEC, Z.: An original test for the detection of antikomplex antibodies responsible for the formation of ABO conflict in pregnancy and in the mothers.
Ginec. Pol., 46/2, 167-170 (1969)

69. SMITH, G.H.: Isoagglutinin titres in heterospecific pregnancy.
J. Path., 57, 113-122 (1945)

70. SOBER, H.A. and PETERSON, E.A.: Protein chromatography on ion exchange cellulose.
Federation Proc., 17, 1116-1126 (1958)

71. SOMERS, H. and KUHNS, W.J.: Blood group antibodies in old age.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 141/3, 1104-1107 (1972)

72. SPEISER, P.: Die Serologie des ABO- bedingten Morbus haemolyticus neonatorum.
Bibl. Haemat., 20, 249-259 (1965)

73. SPEISER, P.: Frequenz und Diagnostik nicht Rhesus (Rh_o) bedingter Immunisierungen.
Päd. u. Pädol., 5, 290-296 (1969)

74. SPEISER, P.: Inkompatibilität von Blutgruppen.
Wien. Med. Wschr., 120/13, 215-217 (1970)

75. STANWORTH, D.R.: A rapid method of preparing pure serum gamma-globulin.
Nature, 188, 156-157 (1960)

76. TOVEY, G.H.: A study of the protective factors in heterospecific pregnancy and their role in the prevention of hemolytic disease of the newborn.
Path. Bact., 57, 295-305 (1945)

77. TOVEY, G.H., LOCKYER, J.W., BLADES, A.N. and FLAVELL, H.C.G.: Ante-natal prediction of ABO haemolytic disease. Brit. J. Haemat., 8, 251-257 (1962)

78. TRIPATZIS, I. und BERNDT, H.: Der Kapillar-Coombs-Test. Zum Nachweis schwacher Immunisierungen besonders bei Inkompatibilität im ABO-System. Ärztl. Lab., 15, 430-439 (1969)

79. UHLENBRUCK, G.: Blutgruppenforschung heute. Internist, 10, 33-42 (1969)

80. UNGER, L.J. and WIENER, A.S.: Excess of group O mothers in ABO hemolytic disease with special reference to the role of the antibody anti-C. Rev. Hemat., 9, 589-599 (1954)

81. VOAK, D.: The serological specifity of the sensitising antibodies in ABO heterospecific pregnancy of the group O mother. Vox Sang., 14, 271-281 (1968)

82. VOAK, D.: The pathogenesis of ABO haemolytic disease of the newborn. Vox Sang., 17, 481-513 (1969)

83. VOAK, D. and BOWLEY, C.C.: A detailed serological study on the prediction and diagnosis of ABO haemolytic disease of the newborn. Vox Sang., 17, 321-348 (1969)

84. WEBB, A.J.: A 30-minute preparative method for isolation of IgG from human serum. Vox Sang., 23, 279-290 (1972)

85. WIENER, A.S. and SONN, E.B.: Permeability of the human placenta to isoantibodies. J. Lab. Clin. Med., 31, 1020-1024 (1946)

86. WIENER, A.S., FREDA, V.J., WEXLER, I.B. and BRANCATO, G.J.: Pathogenesis of ABO hemolytic disease. Am. J. Obstet. and Gynec., 79, 567-592 (1960)

87. WITEBSKY, E.: Interrelationship between the Rh-system and the AB-system. Blood, 2 special issue 2, 66-79 (1948)

88. WOLLNER, D. und PLÜCKTHUN, H.: Klinische und serologische Untersuchungen zur hämolytischen Neugeborenenerkrankung infolge ABO-Unverträglichkeit.
Zschr. Kinderheilk., 81, 609-644 (1958)

89. ZUELZER, W.W. and COHEN, F.: ABO hemolytic disease and hterospecific pregnancy.
Pediat. Clin. North. Amer., 405-428 (1957)

90. CAVALLI-SFORZA, L.: Biometrie; Grundzüge biologisch medizinischer Statistik.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1974)

91. WALTER, E.: Biomathematik für Mediziner.
B.G. Teubner Verlag Stuttgart (1975)

92. MAST, W.K.: Nachweis von IgG-Antikörpern im ABO-System mittels DEAE-Sephadex A-50 bei männlichen und nicht schwangeren weiblichen Blutspendern.
Inaugural-Dissertation, Tübingen (1979)

Für die Stellung des Themas und die freundliche Hilfe bei der Abfassung der Arbeit schulde ich Herrn Professor Dr. med. Werther Schneider besonderen Dank. Weiterhin sei den Assistenten der Blutbank Tübingen, ganz besonders aber meinem Freund, Herrn Karl Mast, für die Anregungen und die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen gedankt. Ebenso möchte ich meiner lieben Frau und meiner Tante an dieser Stelle für ihr geduldiges Schreiben danken.

Lebenslauf

Am 2. Februar 1953 wurde ich, Alfons Schach, als Sohn des Elektrikers Hubert Schach und dessen Ehefrau Theresia Schach, geb. Lämmle, in Horb, Kreis Freudenstadt, geboren.
Am 1. April 1960 wurde ich in die Grundschule Horb eingeschult. Ab Juli 1964 besuchte ich das Gymnasium in Horb. Die Reifeprüfung bestand ich an der dortigen Schule am 9. Juni 1972.
Im Oktober 1972 begann ich das Studium der Medizin an der Eberhard Karls Universität in Tübingen und legte dort im August 1974 die ärztliche Vorprüfung erfolgreich ab. Nachdem ich am 29. August 1975 den ersten Abschnitt, am 17. März 1978 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung und am 2. Mai 1979 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestanden hatte, wurde mir am 4. Mai 1979 die Approbation als Arzt erteilt.

Druck und Gesamtherstellung:

Bölk & Schulz · Kopier- und Drucktechnik
Bismarckstr. 92
7400 Tübingen · Tel. 07071/32321